



CAROLINA DUARTE DE FREITAS

LICENCIADA

**POLI-FOSFORILAÇÃO DE UM COMPONENTE
ESTRUTURAL DO ESPORO DE
*Bacillus subtilis***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Adriano O. Henriques, Professor Doutor, ITQB/UNL

Co-orientadora: Mónica Paula Serrano, Doutora, ITQB/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof. Doutor Luís Jaime Gomes Ferreira da Silva Mota

Vogal: Prof. Doutor Adriano José Alves de Oliveira Henriques



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

setembro de 2014

**POLI-FOSFORILAÇÃO DE UM COMPONENTE
ESTRUTURAL DO ESPORO DE
*Bacillus subtilis***

Copyright Carolina Duarte de Freitas, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Desde já agradeço à Comissão do Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela oportunidade de frequentar esta sexta edição do Mestrado e ao Laboratório de Desenvolvimento Microbiano, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, por me ter recebido.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Adriano Henriques e Doutora Mónica Serrano por tudo o que me ensinaram, dentro e fora do âmbito laboratorial. Ao Professor Adriano pela possibilidade que me deu de trabalhar no Laboratório, pela confiança que depositou em mim para me atribuir este projeto assim como pela orientação enriquecedora não só a nível profissional como também pessoal. Um agradecimento especial à Doutora Mónica pela disponibilidade e paciência para me tirar sempre todas as dúvidas e para esclarecê-las de modo clarividente. Acrescem todos os ensinamentos essenciais que me transmitiu com a sua vasta experiência durante a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Professor Richard Losick e ao Doutor Alexander Elsholz, do *Cell Biology Department* de *Harvard University*, pela realização da análise de espectrometria de massa de extratos de *B. subtilis*. À Dr.^a Erin Tranfield, assim como à licenciada Ana Laura Vinagre, da *Electron Microscopy Facility*, do Instituto Glubenkian de Ciência, pela realização da análise das amostras de esporos por Microscopia Eletrónica de Transmissão e pela ótima cooperação durante a realização deste trabalho.

E, claro, a todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento Microbiano, pelo acolhimento no laboratório e pela disponibilidade em me ajudarem sempre que precisei: Ana Paiva, Catarina Fernandes, Carolina Cassona, Fátima Pereira, Filipa Nunes, Hugo Barreto, Nejka Planinc, Rita Tomé, Patrícia Amaral, Teresa Costa, Teresa Silva e Wilson Antunes.

Por último agradeço aos meus pais, irmã, namorado e amigos por terem tornado possível a realização deste projeto de mestrado.

Resumo

A superfície dos esporos bacterianos é constituída por uma estrutura multi-proteica, denominada manto, com funções de proteção e de interação com o meio circundante. CotB é um componente abundante do manto do esporo de *Bacillus subtilis*. Durante a formação do manto, a proteína CotB, de 46 kDa (CotB-46), sofre uma modificação pós-traducional, que a converte numa espécie com uma mobilidade eletroforética de 66 kDa (CotB-66). Outras duas proteínas do manto, CotH e CotG, são necessárias para a formação de CotB-66. CotH é uma proteína morfogenética essencial para a montagem do manto, e um homólogo estrutural de cinases Ser/Thr de tipo eucariota. CotB, por seu lado, possui quatro repetições de uma sequência rica em serinas/lisinas/argininas na sua metade C-terminal, enquanto que a metade N-terminal contém dois domínios *Sm-like*, associados normalmente a interações RNA-RNA e RNA-proteína. A super-expressão de *cotB* em *E. coli* resulta numa proteína de 46 kDa, mas a co-expressão de *cotB* com *cotG* e *cotH* leva à produção de uma forma de CotB de 66 kDa. Na ausência de CotG ou de CotH ou na presença de uma forma inativa de CotH, com a substituição D228Q no seu centro ativo putativo, não se verifica a formação de CotB-66. CotH sofre auto-fosforilação e é insensível ao inibidor de largo espectro staurosporina. Além disso, mostramos que CotB-46 é fosforilado diretamente por CotH *in vitro*. Descobrimos que a substituição D228Q resulta em alterações na composição, estrutura e propriedades do manto que se aproximam daquelas causadas por uma mutação de eliminação do gene. Mostramos que a modificação de CotB *in vivo* é dependente de CotG e da atividade de cinase de CotH. Sugerimos que durante a formação do manto de *B. subtilis* CotH fosforila CotB na sua metade C-terminal, usando CotG como co-fator.

Palavras-chave: CotB / manto / esporo / fosforilação / *B. subtilis*

Abstract

The surface of bacterial spores consists of a multi-protein structure, called coat, with functions of protection and interaction with the immediate environment. CotB is an abundant component of the spore coat of *Bacillus subtilis*. During the formation of the coat, CotB protein, of about 46 kDa (CotB-46), undergoes a post-translational modification, which converts it into a species with an electrophoretic mobility of 66 kDa (CotB-66). Two other coat proteins, CotH and CotG, are necessary for the formation of CotB-66. CotH is a morphogenetic protein essential for proper assembly of the coat, and a structural homologue of Eukaryote-like Ser/Thr kinases. CotB, in turn, shows a C-terminal region with four repeats of a serine/lysine/arginine rich sequence, and two Sm-like domains typically associated with RNA-RNA and RNA-protein interactions, in its N-terminal moiety. While the over-expression of *cotB* in *E. coli* results in the accumulation of a 46kDa protein, the co-expression of *cotB* with *cotG* and *cotH* results in the accumulation of a form of CotB with a mobility of 66 kDa. Furthermore, the absence of CotG or CotH or the production of inactive CotH, bearing a D228Q in its putative active site, prevents formation of CotB-66. We found that CotH undergoes auto-phosphorylation and is insensitive to staurosporine, a broad-spectrum inhibitor. In addition, we show that CotB-46 is phosphorylated by CotH. Therefore, CotH phosphorylates CotB *in vitro*. We discovered that *in vivo* the D228Q substitution results in alterations in the composition, structure and functional properties of spores that approach those seen for a *cotH* deletion mutant. We suggest that during the assembly of the *B. subtilis* coat CotH phosphorylates CotB in its C-terminal, using CotG as a co-factor.

Keywords: CotB / coat / spore / phosphorylation / *B. subtilis*

Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
min	Minutos
DO	Densidade Óptica
TA	Temperatura Ambiente
ddH ₂ O	Água bi-destilada
rpm	Rotações por minuto
nm	Nanómetro
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
V	Volt
ml	Mililitro
µl	Micro litro
h	Hora
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Micramolar
°C	Graus Celsius
g	Força-g
kDa	Kilo Daltons
::	Interrupção ou junção
Δ	Eliminação
~	Aproximadamente
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
Kan	Kanamicina
Neo	Neomicina
Sp	Spectinomicina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
BSA	Albumina do soro bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
wt	Estirpe ou fenótipo selvagem
N	Asparagina
A	Alanina
G	Glicina
L	Leucina

Y	Tirosina
F	Fenilalanina
K	Lisina
R	Arginina
S	Serina
I	Isoleucina
D	Aspartato
P	Prolina
E	Glutamato
V	Valina
Q	Glutamina
W	Triptofano
H	Histidina
T	Treonina
C	Cisteína
M	Metionina
DSM	Meio de esporulação da Difco
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
SOE-PCR	PCR por extensão de fragmentos sobreponíveis (Splicing Overlapping Extension PCR)
PSI	Pound Force per Square Inch
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB agar	Meio de cultura Luria-Bertani solidificado com agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
GFK	Meio de Glucose, Frutose e Cloreto de potássio
L-asn	L-asparagina
MET	Microscopia Eletrónica de Transmissão
DTT	Ditiotreitol
HRP	Horseradish peroxidase
SDS-PAGE	Eletroforese em géis desnaturantes de acrilamida contendo SDS (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Abreviaturas e Símbolos	v
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	1
1.2 Esporulação	2
1.3 Montagem do manto	3
1.4 As proteínas estruturais CotB e CotG.....	5
1.5 A proteína morfogenética CotH.....	7
1.6 Objetivos	9
2. Material e métodos	11
2.1 Técnicas Microbiológicas.....	11
2.1.1. Estirpes e condições gerais de crescimento	11
2.1.2 Indução da esporulação.....	11
2.1.3 Purificação de esporos em gradiente de densidade.....	11
2.1.4 Ensaio de resistência dos esporos ao calor e à lisozima.....	12
2.1.5 Determinação da eficiência de germinação	12
2.1.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	12
2.2 Técnicas gerais de genética microbiana e de biologia molecular.....	13
2.2.1 Extração de DNA plasmídico em pequena escala	13
2.2.2 Extração e purificação de DNA plasmídico por troca iónica	14
2.2.3 Extração do DNA genómico de <i>B. subtilis</i>	14
2.2.4 Preparação e transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	14
2.2.5 Preparação de células competentes de <i>B. subtilis</i> e a sua transformação	15
2.2.6 Eletroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose	15
2.2.7 Manipulações enzimáticas do DNA	15
2.2.8 Extração das proteínas do manto do esporo.....	16
2.2.9 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	16
2.2.10 Deteção imunológica de proteínas imobilizadas	17
2.2.11 Super-produção e purificação de proteínas recombinantes	17

2.3 Técnicas bioquímicas	18
2.3.1 Desfosforilação de proteínas.....	18
2.3.2 Ensaios de fosforilação <i>in vitro</i> com [γ^{32} P]ATP.....	18
3. Resultados	19
3.1 CotB é uma proteínas fosforilada do manto do esporo de <i>B. subtilis</i>	19
3.2 Construção do mutante pontual CotH ^{D228Q}	20
3.3 Acumulação do mutante CotH ^{D228Q} nos esporos de <i>B. subtilis</i>	22
3.4 Caracterização fenotípica: resistência ao calor, lisozima, eficiência de germinação e recrutamento das proteínas para o manto do esporo	23
3.5 Efeito de CotH ^{D228Q} na correta montagem de CotB no manto	24
3.6 Mutação pontual de CotH e mutação de eliminação de CotB afetam a correta morfogênese do manto do esporo	25
3.7 Construção de CotH-Strep-tag	27
3.8. Super-produção e purificação de CotB-His ₆ , CotH ^{WT} -Strep-tag e CotH ^{D228Q} -Strep-tag	29
3.8.1 Auto-fosforilação de CotH dependente de concentração	30
3.8.2 Atividade de CotH insensível a staurosporina	31
3.8.3 CotH fosforila CotB-46 purificado <i>in vitro</i>	32
4. Discussão	35
5. Bibliografia	43
6. Anexos	47
6.1 Anexo 1 – Estirpes utilizadas neste estudo.....	47
6.2 Anexo 2 – Plasmídeos utilizados neste estudo.....	48
6.3 Anexo 3 - Oligonucleotídeos	49
6.4 Anexo 4 – Meios de cultura	50
6.5 Anexo 5 – Antibióticos	51
6.6 Anexo 6 – Soluções	52

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Ciclo vegetativo e de esporulação/germinação de <i>B. subtilis</i> .	2
Figura 1.2 - Constituição do esporo de <i>Bacillus subtilis</i> .	4
Figura 1.3 - Região de <i>cotB-cotG-cotH</i> do cromossoma de <i>B. subtilis</i> .	6
Figura 1.4 - As proteínas estruturais CotB e CotG.	7
Figura 1.5 - Análise bioinformática da proteína CotH.	8
Figura 1.6 - Produção de CotB, CotG, CotH ^{wt} e CotH ^{D228Q} em <i>E. coli</i> .	9
Figura 3.1- Tratamento, com fosfatase, de proteínas extraídas do manto do esporo.	20
Figura 3.2 - Construção e caracterização do mutante pontual CotH ^{D228Q} .	21
Figura 3.3 - Extração por SDS-DTT das proteínas do manto do esporo e eficiência de germinação.	24
Figura 3.4 - Mutação pontual para a alanina no centro ativo de CotH e mutações de eliminação de <i>cotH</i> ou de <i>cotB</i> afetam a morfogénese do manto.	26
Figura 3.5 - CotH fundida com cauda de streptavidina no seu C-terminal mantém-se funcional.	28
Figura 3.6 - Purificação da proteína CotB-His ₆ e das proteínas CotH ^{wt} -Strep e CotH ^{D228Q} -Strep por cromatografia de afinidade.	29
Figura 3.7 - Auto-fosforilação dependente de concentração.	30
Figura 3.8 - Insensibilidade de CotH a staurosporina.	31
Figura 3.9 - Fosforilação de CotB-46 e auto-fosforilação de CotH <i>in vitro</i> .	32
Figura 4.1 - Estrutura macromolecular do esporo de <i>B. anthracis</i> .	37
Figura 4.2 - Modelo para a interação de CotH, CotB e CotG.	40

Índice de Tabelas

Tabela 6.1 - Estirpes utilizadas neste estudo.....	47
Tabela 6.2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho	48
Tabela 6.3 - Oligonucleotídeos utilizados neste estudo	49
Tabela 6.4 - Composição dos meios de cultura utilizados neste estudo.....	50
Tabela 6.5 - Antibióticos utilizados neste trabalho e respectivas concentração de utilização e de stock.....	51
Tabela 6.6 - Soluções utilizadas neste trabalho	52

1. Introdução

1.1 *Bacillus subtilis*

A bactéria Gram-positiva *B. subtilis* é um organismo não patogénico, comumente encontrado no solo. Este organismo atrai especial atenção pela sua capacidade de se diferenciar num tipo celular metabolicamente inativo, designado de endósporo que lhe permite sobreviver em ambientes extremos (Hilbert & Piggot, 2004, Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*, 2012). Os endósporos (daqui em diante designados por esporos) demonstram uma elevada resistência a diversas condições ambientais desfavoráveis como calor, solventes, agentes oxidantes, enzimas líticas, radiação UV e predadores (Nicholson *et al.*, 2000).

Tal como *B. subtilis*, diversas bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo G/C do filo firmicutes, são capazes de produzir esporos. Estes organismos firmicutes esporulantes possuem diferentes necessidades metabólicas, incluindo heterotróficos aeróbios (*Bacillus spp.*), halófilos (*Sporosarcina halophil*), fermentadores de lactato microaerófilos (*Sporolactobacillus spp.*), anaeróbios (*Clostridium spp.*), redutores de sulfato e fototróficos (*Helicobacterium e Heliophilum spp.*). Esta diversidade contribui, de certo modo, para a colonização por parte destas bactérias numa ampla variedade de habitats. É de realçar a importância deste grupo de organismos a nível ambiental que incluiu patogénicos de insetos, estirpes utilizadas industrialmente na degradação da celulose, assim como patogénicos humanos responsáveis por doenças como carbúnculo, botulismo e tétano (Schwarz, 2001, Galperin *et al.*, 2012). No caso dos patogénicos, como por exemplo *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile* e *Clostridium tetani*, a sua capacidade de formar esporos está intimamente ligada ao seu potencial de virulência (Rineh *et al.*, 2014, Lightfoot *et al.*, 2014)

Sendo o esporo a forma celular mais resistente conhecida, a compreensão dos mecanismos de diferenciação celular e daqueles responsáveis pela sua capacidade de sobrevivência têm sido uma das motivações dos intensos estudos feitos aos organismos esporulantes desde há mais de um século (Nicholson *et al.*, 2000).

Devido à existência de sofisticadas ferramentas para a sua manipulação genética, *B. subtilis* tornou-se um organismo modelo não só para estudos de desenvolvimento, mas também para o estudo da fisiologia microbiana de um modo geral. A sequenciação do genoma da estirpe *B. subtilis* 168 em 1997 tornou também possível a análise funcional de um grupo mais vasto de bactérias Gram-positivas (Kunst *et al.*, 1997, Harwood & Moszer, 2002).

As características de resistência e de não patogenicidade dos esporos de *B. subtilis* fazem deste organismo um alvo para aplicações na área da vacinologia, biotecnologia e probióticos (Kim & Schumann, 2009, Hong *et al.*, 2008, Potot *et al.*, 2010).

1.2 Esporulação

A carência nutricional nomeadamente de carbono, azoto e, em algumas circunstâncias, fósforo, assim como a densidade celular elevada são condições para a indução da esporulação (Hilbert & Piggot, 2004, Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*, 2012). Os sinais que levam à iniciação da esporulação resultam da ativação por fosforilação de um regulador transcricional chamado Spo0A. Este fator de transcrição é o regulador principal da esporulação capaz de ativar ou reprimir diretamente cerca de 121 genes, alguns deles essenciais à esporulação (McKenney *et al.*, 2012). Em termos morfológicos, a primeira mudança durante o processo de esporulação é a formação de um septo perto de um dos polos da célula, dividindo-a em dois compartimentos desiguais – divisão assimétrica (figura 1.1; Hilbert & Piggot, 2004, Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*, 2012).

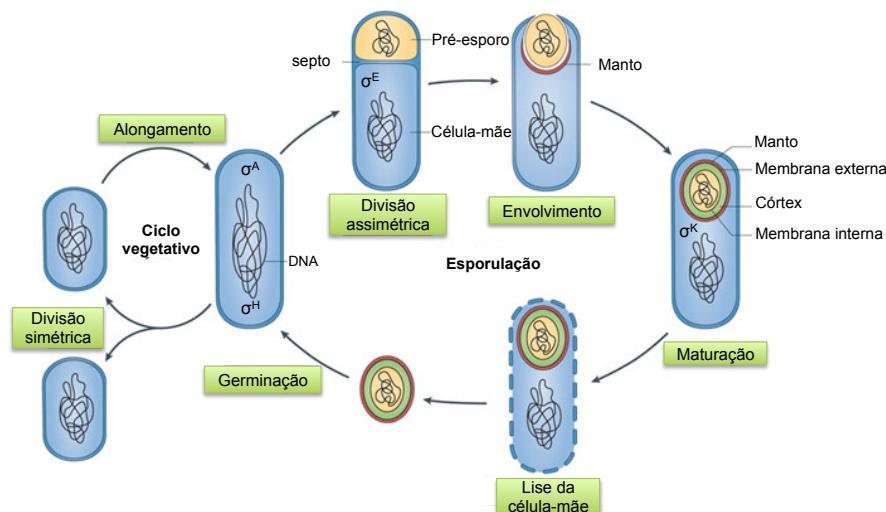


Figura 1.1 - Ciclo vegetativo e de esporulação/germinação de *B. subtilis*. Durante o ciclo vegetativo, o crescimento da célula dá-se ao longo do seu eixo longitudinal (alongamento). Quando o comprimento da célula atinge o dobro do seu tamanho ao tempo da divisão, tem lugar uma nova divisão e segregação do cromossoma. A divisão celular vegetativa produz duas células de dimensão idêntica, ambas dotadas de uma cópia do genoma. O ciclo alternativo de esporulação, ocorre apenas quando as células são sujeitas a condições adversas. A esporulação começa quando a célula divide assimetricamente para formar dois compartimentos de tamanhos diferentes: a célula-mãe e o pré-esporo, separados por um septo (divisão assimétrica). Após migração e fusão das membranas do septo assimétrico (processo de envolvimento), o pré-esporo torna-se num protoplasto totalmente rodeado pelo citoplasma da célula-mãe. A formação do manto começa no polo oposto ao pré-esporo, logo a seguir ao início do envolvimento e continua durante a esporulação. O córtex é montado entre a membrana interna e externa do esporo. Após maturação do esporo e lise da célula-mãe, este acaba por ser libertado para o meio ambiente. Quando em ótimas condições o esporo tem a capacidade de germinar, re-entrando no ciclo vegetativo. Adaptado de (McKenney *et al.*, 2012)

O compartimento mais pequeno, o pré-esporo, vai dar origem ao esporo maduro, e o compartimento maior, a célula-mãe, vai contribuir para o processo de diferenciação. O cromossoma bacteriano duplica-se e uma das cópias do cromossoma é transferida para o pré-esporo (figura 1.1 ;

Hilbert & Piggot, 2004, Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*, 2012). Após a conclusão do processo de segregação do cromossoma para o pré-esporo, a célula-mãe inicia um processo de migração da dupla membrana do septo em redor do pré-esporo. No final deste envolvimento, o pré-esporo fica isolado do meio, rodeado pelo citoplasma da célula-mãe e envolvido por duas membranas (figura 1.1). Entre estas duas membranas que rodeiam o pré-esporo irá ocorrer a deposição de duas camadas de peptidoglicano: a parede celular primordial e o córtex. Em paralelo, ocorre a deposição de uma estrutura proteica em redor do pré-esporo denominada de manto (figura 1.1). Segue-se um período de maturação, onde se desenvolvem as propriedades de resistência à radiação UV e a temperaturas elevadas. No final do processo, a célula-mãe sofre autólise, libertando o esporo (figura 1.1). Quando surgem de novo condições favoráveis ao crescimento, os esporos são capazes de quebrar o seu estado de dormência e produzir, num processo designado de germinação, uma nova população de células vegetativas que passa a reproduzir-se por divisão simétrica (figura 1.1 ; Hilbert & Piggot, 2004, Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*, 2012).

As alterações morfológicas que ocorrem durante a esporulação são governadas a nível genético pelo aparecimento sucessivo de factores σ alternativos da polimerase do RNA, cuja atividade é controlada por cascatas de sinalização entre os dois compartimentos. Após a divisão assimétrica, σ^F é ativado no pré-esporo e σ^E na célula-mãe. Após o envolvimento do pré-esporo pela célula-mãe estar finalizado, o σ^G e σ^K são ativados no pré-esporo e na célula-mãe, respetivamente, sendo ambos responsáveis pelo controlo dos estágios tardios de diferenciação (Hilbert & Piggot, 2004).

1.3 Montagem do manto

O esporo tem uma arquitetura característica que é, em parte, responsável pelas suas propriedades de resistência; É constituído por um compartimento central, que contém o material genético, delimitado pela membrana interna do esporo. Esta membrana, por sua vez, é coberta pela parede celular germinal, que está protegida pelo córtex. O córtex é constituído por peptidoglicano e é essencial para a desidratação do esporo e para a resistência ao calor. Esta estrutura, sintetizada a partir da célula-mãe, encontra-se justaposta à membrana externa do esporo. A estrutura mais externa do esporo em muitas espécies é o manto. Trata-se de uma estrutura proteica diferenciada em quatro camadas principais: uma primeira estrutura mais fina denomina-se de camada basal, as duas camadas intermédias são o manto interno e externo e recentemente foi identificada uma camada mais externa denominada crosta (Henriques & Moran, 2007). A crosta possui uma estrutura flexível que lhe permite expandir e retrair em resposta a parâmetros ambientais como a humidade. O manto é determinante na proteção do esporo contra fatores químicos e físicos; em particular, é essencial para a resistência do esporo a enzimas líticas, nomeadamente aquelas produzidas por predadores, e também é determinante na monitorização do meio circundante e na germinação (Henriques & Moran, 2007, McKenney *et al.*,

2012).

A primeira descrição da estrutura do manto foi efetuada recorrendo a microscopia eletrónica de transmissão. As camadas externa e interna do manto conseguem-se distinguir com a coloração de tetróxido de ósmio, sendo que o manto externo apresenta uma coloração mais negra e o manto interno uma coloração mais clara contendo lamelas concêntricas escuras (figura 1.2 A). A coloração com vermelho de ruténio permite visualizar também a crosta (figura 1.2 A).

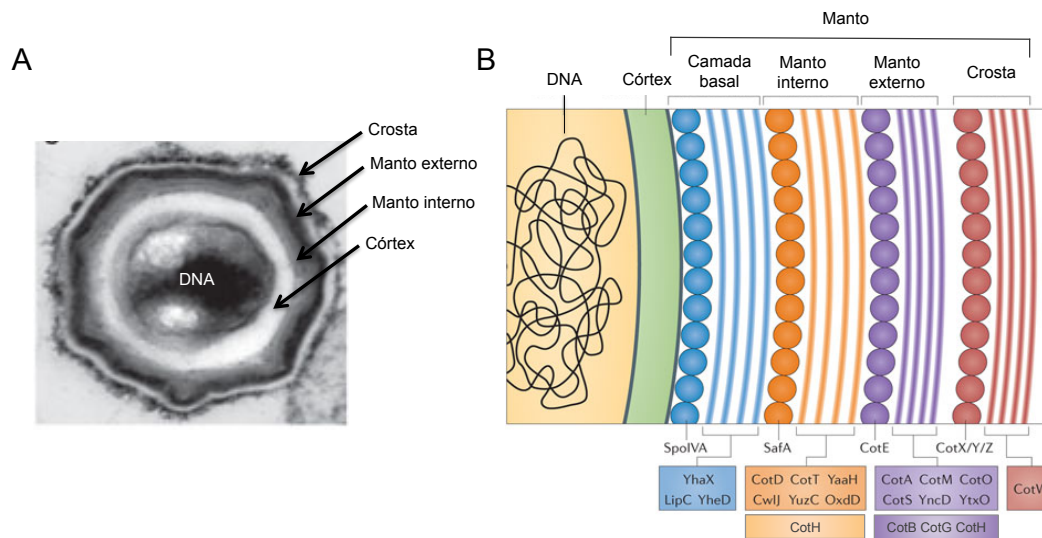


Figura 1.2 - Constituição do esporo de *Bacillus subtilis*. Imagem de microscopia eletrónica de transmissão de um corte transversal de um esporo de estirpe selvagem de *B. subtilis* (A) e ilustração do modelo corrente da constituição do manto (B). A) As estruturas do esporo visíveis na imagem estão respetivamente identificadas com setas. Devido à utilização de corante vermelho de ruténio é possível visualizar a crosta, camada do manto não visível na coloração de tetróxido de ósmio, normalmente usada. Retirado de (McKenney *et al.*, 2012). B) As proteínas morfogénicas necessárias à formação de cada uma das camadas do manto estão representadas na figura (SpoIVA, SafA, CotE e CotX/Y/Z). Estão também identificados alguns dos constituintes enzimáticos e estruturais do manto assim como a sua respetiva localização. Destacadas estão a proteína CotB e outras duas proteínas constituintes do manto, CotH e CotG, que vão ser abordadas neste trabalho. Adaptado de (McKenney *et al.*, 2012).

A formação do manto começa após a divisão assimétrica e continua durante e após o envolvimento do pré-esporo pela célula-mãe (figura 1.1). Inicialmente o manto forma uma estrutura que está organizada em múltiplas camadas num dos polos do esporo, sendo que de seguida o manto envolve o esporo em múltiplas ondas de agregação co-ordenadas (McKenney *et al.*, 2012). A síntese das proteínas do manto de *B. subtilis* ocorre segundo uma cascata regulatória hierárquica de quatro factores de transcrição que atuam na célula-mãe sequencialmente: σ^E , SpoIID, σ^K e GerE (Henriques & Moran, 2007). O processo de montagem do manto é realizado por proteínas morfogénicas cuja função reside no recrutamento de outras proteínas do manto para a superfície do esporo assim como no assegurar da correta localização das mesmas. Exemplos de proteínas morfogénicas são SpoIVA, necessária para a formação de camada basal, SafA e CotE, responsáveis pela montagem do manto interno e externo, respetivamente e CotX, CotY e CotZ, componentes chave na construção da última camada, a crosta (figura 1.2 B; McKenzie *et al.*, 2012). Em células em que SpoIVA, SafA ou CotE

estejam ausentes o manto não localiza à superfície do esporo e aparece muitas vezes solto a flutuar no citoplasma da célula-mãe, em alguns casos também a formação do córtex é afectada. No caso da ausência de CotX/Y/Z é apenas a crosta que aparece desagregada da superfície do esporo (McKenney *et al.*, 2012).

Enquanto que σ^E e SpoIIID controlam a síntese das proteínas morfogenéticas, σ^K é responsável pela expressão de uma classe mais tardia de genes do manto assim como pela transcrição da proteína reguladora GerE. GerE atua juntamente com σ^K para ativar a classe mais tardia dos genes *cot*, mas também atua diretamente noutros genes *cot*, reprimindo a sua expressão (Hilbert & Piggot, 2004). O manto como unidade funcional é composto não só por proteínas estruturais e morfogenéticas mas também por enzimas que retêm atividade de proteção e de monotorização do meio (Henriques & Moran, 2007).

Uma vez que o envolvimento do esporo por proteínas morfogenéticas decorre segundo uma sequência temporal e sob o controlo dos quatro fatores de transcrição aqui referidos, este representa o primeiro fenómeno dotado de organização, na morfogénese do manto. A formação desta estrutura é assim considerada um modelo de montagem de organelos em bactérias.

A correta montagem do manto depende de processos como o controlo da tradução e modificações pós-traducionais tais como processamento proteolítico, fosforilação, glicosilação, e interações entre proteínas por ligações covalentes. A contribuição exata destes mecanismos é praticamente desconhecida e a determinação da sua natureza e do seu papel irá permitir uma caracterização estrutural e funcional de determinados componentes do manto. Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na morfogénese desta camada protetora do esporo, centrámos os nossos esforços na caracterização de duas das proteínas mais abundantes no esporo de *B. subtilis*, CotB e CotG, e na proteína morfogenética responsável pela correta montagem de ambas no manto, CotH.

1.4 As proteínas estruturais CotB e CotG

CotB é uma das proteínas mais abundantes do manto externo. A sua abundância assim como a sua localização à superfície do esporo têm sido fatores revelantes explorados tanto na produção de enzimas de interesse biotecnológico como na criação de potenciais vacinas através da exposição de antígenos à superfície dos esporos (Isticato *et al.*, 2001, Duc le *et al.*, 2003). A expressão de *cotB* resulta na acumulação de um polipéptido de 46 kDa (CotB-46) que, após uma modificação pós-traducional, é convertido numa forma de 66 kDa (CotB-66) que acumula no esporo de *B. subtilis* (Zilhao *et al.*, 2004). No mapa genético, o gene *cotB* está agrupado com outros dois genes, *cotH* e *cotG* (figura 1.3A). A expressão dos três genes está sob o controlo conjunto de σ^K e GerE (figura 1.3 A, B e C; Giglio *et al.*, 2011, Sacco *et al.*, 1995). A montagem de CotB-66 é dependente tanto da expressão de *cotH* como de *cotG*. *In vitro* CotB interage consigo mesmo e com CotG, e as duas

proteínas formam complexos, *in vivo* (Zilhao *et al.*, 2004). O modelo corrente dita que a proteína CotH é necessária para a estabilização de CotG, permitindo assim a sua interação com CotB e consequente formação de CotB-66 (Zilhao *et al.*, 2004).

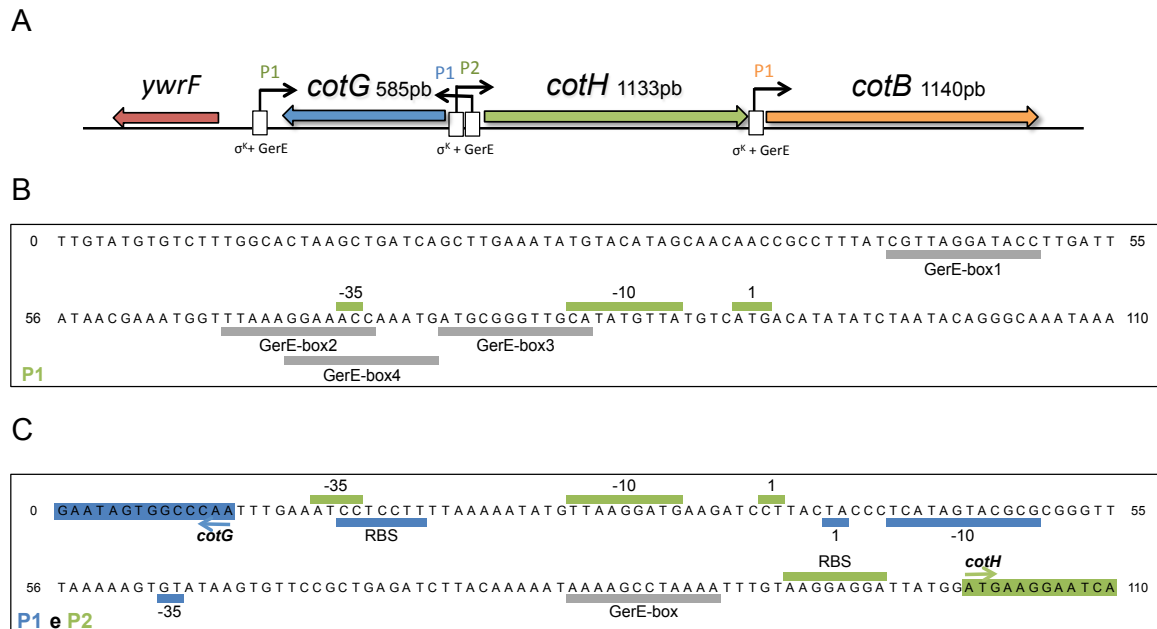


Figura 1.3 - Região de *cotB-cotG-cotH* do cromossoma de *B. subtilis*. Representação esquemática (A) e sequências nucleotídicas das regiões promotoras (B,C) da região de *cotB-cotG-cotH*. A) As caixas brancas representam as regiões promotoras e as setas indicam o sentido da transcrição. O gene *cotB* possui uma região promotora (P1 laranja), o gene *cotG* possui uma região promotora (P1 azul) e o gene *cotH* possui duas regiões promotores, uma a jusante e outra a montante da sequência de *cotG* (P1 e P2 verde, respetivamente). A região P2 de *cotH* e a região P1 de *cotG* estão sobrepostas. B) Sequência nucleotídica do promotor P1 de *cotH*. O sublinhado verde, identifica as sequências dos locais -35, -10 e +1. Sublinhadas a cinzento estão as sequências reconhecidas por GerE. C) Sequência nucleotídica do promotor de *cotG* (P1 azul) e do promotor P2 de *cotH*. Os locais -35, -10, +1, RBS estão sublinhados a verde no caso do promotor de *cotH* e a azul no promotor de *cotG*. A sequência das regiões codificantes de cada gene estão preenchidas com as respetivas cores. As setas indicam o sentido da transcrição. Nucleótidos: A-adenina T-timina C-citosina G-guanina.

A pesquisa de homólogos de CotB e CotG usando o pBLAST identifica apenas proteínas presentes em bactérias esporulantes. No entanto, numa busca para homólogos estruturais utilizando o servidor Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009), descobrimos que a região N-terminal de CotB (os primeiros 145 de 380 resíduos) contém dois motivos *Sm-like*. As proteínas *Sm-like*, como por exemplo a proteína bacteriana Hfq, possuem a capacidade de modular interações RNA-RNA e RNA-proteína (Wilusz & Wilusz, 2005). Os domínios *Sm-like* fazem normalmente parte de estruturas hexaméricas, de modo a permitir os mecanismos de ligação ao RNA. A função destes domínios na proteína CotB é desconhecida. A região C-terminal de CotB (resíduos 253 a 375) contém quatro repetições de sequências ricas em serinas, lisinas e argininas (figura 1.4 A). O mesmo ocorre em CotG, cuja região central (resíduos 22 a 156) é formada por cinco repetições de um motivo rico em serinas, lisina e argininas (figura 1.4 B).

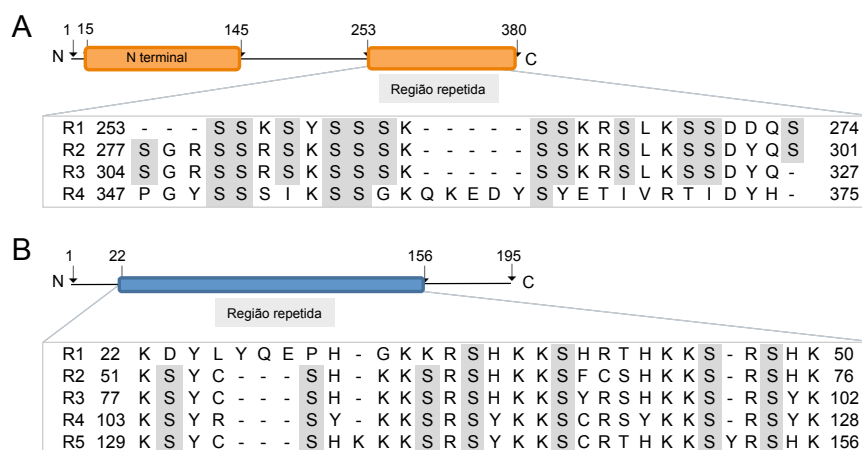


Figura 1.4 - As proteínas estruturais CotB e CotG. A e B) Representação esquemática da proteína inteira e sequência de aminoácidos das regiões repetidas das proteínas CotB (A) e CotG (B). Na representação da estrutura primária de cada proteína estão identificadas as extremidades N terminal e C terminal. Os números que estão assinalados com setas representam a posição dos resíduos na proteína. Tal como CotG (Sacco *et al.*, 1994), CotB também revelou a presença de repetições conservadas em tandem na sua sequência. A sequência de aminoácidos está representada dentro de retângulos, sendo que no início de cada repetição em tandem está indicado o número da mesma antecedido pela letra “R”. As posições do primeiro e último resíduos de cada repetição estão indicados no início e no fim de cada linha respetiva. Os resíduos suscetíveis de fosforilação (serinas) estão marcados a cinzento.

1.5 A proteína morfogenética CotH

Estudos anteriores demonstram que CotH é necessária para a montagem do manto (Naclerio *et al.*, 1996, Zilhão *et al.*, 1999). A sua eliminação no genoma de *B. subtilis* tem efeitos pleiotrópicos na montagem de vários componentes do manto externo tais como CotB, CotC e CotG. Em microscopia eletrónica foi possível verificar que CotH é necessária para a correta formação das camadas interna e externa do manto (Zilhão *et al.*, 1999). Além disso, os esporos do mutante nulo *cotH* revelam deficiência nos níveis de germinação (Naclerio *et al.*, 1996, Saggese *et al.*, 2014). Foi recentemente descrito que este efeito negativo do mutante *cotH* deve ser causado não pela ausência de CotH por si só, mas pela presença de CotG num fundo *cotH*. Isto porque num mutante duplo *cotG/cotH* o fenótipo de germinação é restabelecido para valores semelhantes ao da estirpe selvagem. Tal sugere um papel protetor de CotH na neutralização do efeito prejudicial de CotG (Saggese *et al.*, 2014). Ao fazermos a análise bioinformática recorrendo ao Phyre2 verificamos que CotH é estruturalmente semelhante a cinases de serina/treonina (Ser/Thr) do tipo eucariota, como CtkA e HipA (Tagliabracci *et al.*, 2012, Schumacher *et al.*, 2012, Kim do *et al.*, 2010). Constatamos também a presença de um centro ativo conservado (Figura 1.5 painel A e B). Normalmente, como resposta a estímulos externos as cinases sofrem auto-fosforilação ocorrendo de seguida a transferência do fosfato para os seus substratos proteicos (Pereira *et al.*, 2011). A fosforilação de aminoácidos específicos, como a serina ou a treonina, podem controlar a atividade das proteínas alvo por modificação direta do seu centro ativo ou, de modo indireto, regulando interações proteína-proteína. O papel fisiológico de cinases Ser/Thr do

tipo eucariota está relacionado com processos de desenvolvimento celular, metabolismo secundário, divisão celular e síntese de parede celular e ainda metabolismo central e virulência (Pereira *et al.*, 2011).

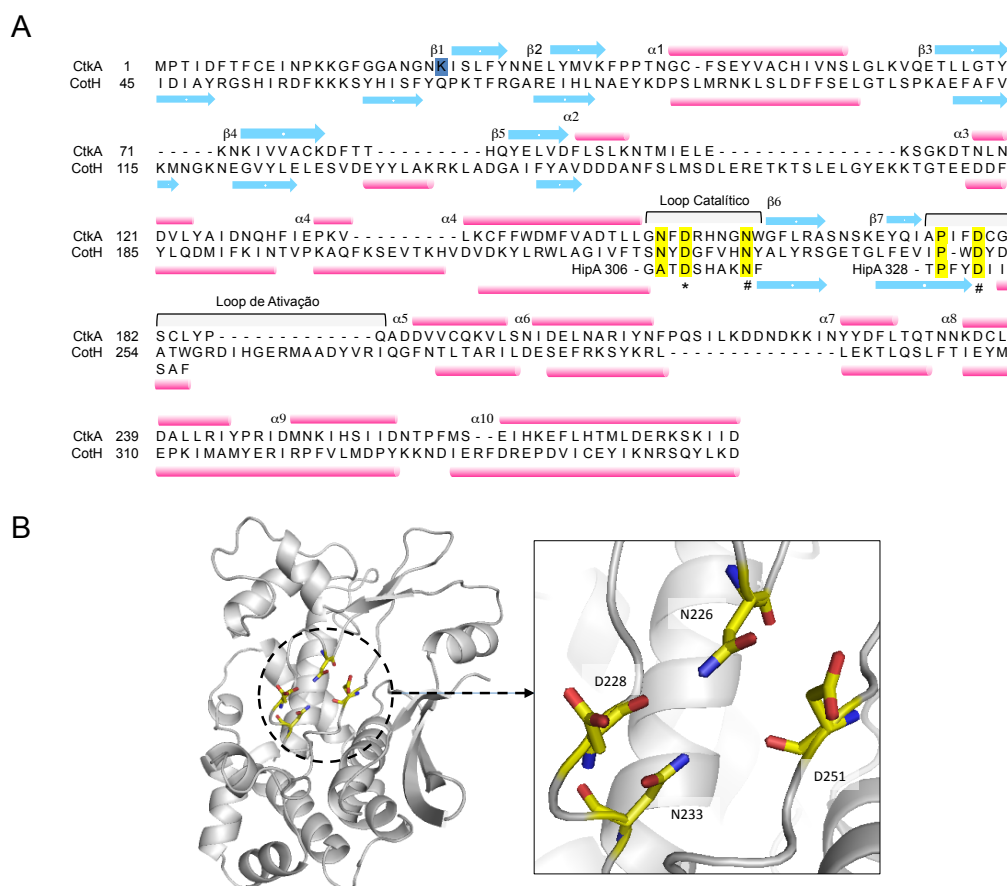


Figura 1.5 - Análise bioinformática da proteína CotH. A) Alinhamento de CotH com duas cinases homólogas CtkA (de *Helicobacter Pylori*) e HipA (de *Escherichia coli*). Estas são cinases de serina/treonina do tipo eucariota. Os resíduos conservados estão assinalados a amarelo. O resíduo catalítico e os resíduos de ligação ao Mg^{2+} estão marcados com asterisco (*) e cardinal (#), respetivamente (Correia *et al.*, 2006). A lisina 24 de CtkA, característica de cinases atípicas e importante para a insensibilidade ao inibidor staurosporina, está assinalada a azul (Xiao *et al.*, 2013). As posições do primeiro resíduo da região alinhada de cada proteína estão indicadas no início das linhas. As folhas β estão indicadas com setas azuis e as hélices α estão indicadas por cilindros rosa, sendo que se encontram acima da sequência no caso de CtkA e abaixo da sequência no caso de CotH. B) Modelo da estrutura de CotH. A imagem no quadrado é uma ampliação da zona do loop catalítico da proteína. Os aminoácidos conservados (três do loop catalítico e do um loop de ativação) estão representados esquematicamente. A estrutura foi obtida a partir do servidor Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009).

Resultados preliminares do laboratório mostram que CotB quando produzido em *Escherichia coli* acumula uma forma de 46 kDa. No entanto a produção de CotB juntamente com CotH e CotG leva à acumulação de uma forma de CotB de 66 kDa, semelhante à presente nos esporos de *B. subtilis*. Este resultado mostra que CotG e CotH são necessários e suficientes para a modificação pós-traducional de CotB. O uso de um anticorpo que reconhece grupos fosforil ligados a serinas (anti-Pser) confirmou

que a modificação de que CotB é alvo em *E. coli* quando produzido na presença de CotG e CotH é uma fosforilação. Por sua vez, quando CotB é produzido na presença de uma forma mutada de CotH (CotH^{D228Q}), prevista não apresentar atividade cinase (Correia *et al.*, 2006), este não sofre modificação pós-traducional, como demonstrado pela acumulação da forma de 46 kDa (figura 1.6 A e B) e pela não detecção com anti-Pser (figura 1.6 C). Estes resultados sugerem que em *E. coli* CotH tem atividade de cinase capaz de fosforilar CotB na presença de CotG (Fig. 1.6).

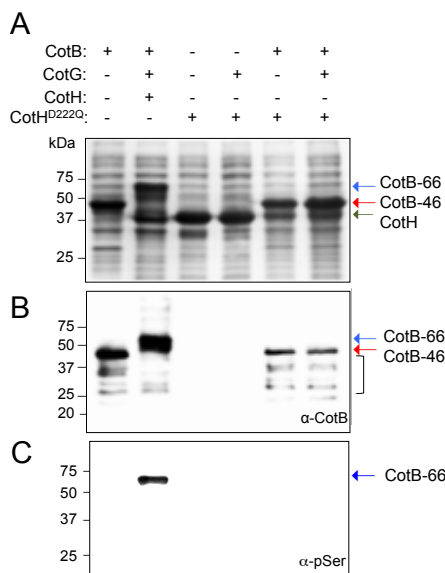


Figura 1.6 - Produção de CotB, CotG, CotH^{wt} e CotH^{D228Q} em *E. coli*. As culturas com as diferentes combinações de proteínas foram induzidas em meio de auto-indução (anexo 4) durante 18 h. As células na suspensão foram lisadas mecanicamente, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração com coomassie (A) ou seguido de detecção imunológica de proteínas imobilizadas (B,C). Para a detecção imunológica proteica foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CotB (Painel B) ou anti-Pser (Painel C). A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis. A posição das proteínas CotB-66, CotB-46 e CotH está indicada do lado direito dos painéis por uma seta a azul, vermelho e verde, respectivamente.

1.6 Objetivos

O manto, como unidade funcional é constituído por enzimas, que retêm atividade à superfície do esporo, por proteínas morfogenéticas e por proteínas estruturais. Este trabalho incidiu sobre os mecanismos moleculares que governam a montagem desta estrutura importante para a interação com o meio envolvente, sendo que nos centrámos na caracterização do componente estrutural CotB e no envolvimento das proteínas CotG e CotH na sua modificação pós-traducional. Estes três genes são transcritos sob o comando σ^K e GerE. CotG e CotH são necessários para a conversão de CotB-46 na forma CotB-66 (Zilhão *et al.*, 2004). A função de CotB é ainda desconhecida. CotH é um componente importante na morfogénese do manto de *B. subtilis* (Naclerio *et al.*, 1996, Zilhão *et al.*, 1999). Uma análise bioinformática revelou que CotH se assemelha a cinases Ser/Thr. Resultados preliminares indicam que CotH fosforila CotB em *E. coli*, mas a sua ação *in vivo* não foi ainda analisada.

Os nossos objectivos específicos deste trabalho foram assim definidos:

- i) Confirmação que a forma CotB-66 presente no manto do esporo de *B. subtilis* corresponde a uma forma poli-fosforilada e que mutações em *cotG* e em *cotH* influenciam a fosforilação de CotB.
- ii) Estudo do impacto da perda da atividade de cinase de CotH, através da análise fenotípica do mutante *cotH*^{D288Q}: resistência ao calor e à lisozima, capacidade de germinação e efeito na morfogénese do manto;
- iii) Demonstração *in vitro* da atividade de cinase de CotH purificada: avaliação da sua capacidade de auto-fosforilação e de fosforilação de CotB-46.

2. Material e métodos

2.1 Técnicas Microbiológicas

2.1.1. Estirpes e condições gerais de crescimento

Neste estudo, a estirpe de *E. coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, BRL) foi utilizada como hospedeiro para clonagem molecular e para a propagação de plasmídeos, enquanto que a estirpe BL21(DE3) foi utilizada para a super-produção de proteínas (tabela 6.1). Todas as estirpes de *B. subtilis* utilizadas são congênicas com a estirpe MB24 (*trpC2 metC3*) e são também listadas na Tabela 6.1.

O meio de Luria-Bertani (LB), líquido ou solidificado com agar (ver anexo 4) foi utilizado para o crescimento rotineiro de *E. coli* e de *B. subtilis*. A seleção e a manutenção de transformantes de *E. coli* e de *B. subtilis* foram efectuadas mediante a utilização de diversos antibióticos a concentrações seletivas apropriadas (tabela 6.5).

2.1.2 Indução da esporulação

A esporulação em *B. subtilis* foi induzida por crescimento e exaustão de nutrientes em meio de esporulação da Difco (DSM, ver anexo 4, tabela 6.4). A partir de um pré-inóculo crescido em LB a 37°C durante 6 horas a 180 rpm, foram inoculados 100 ml de DSM para uma densidade óptica (DO) a 600 nm (DO₆₀₀) aproximada de 0.05. A cultura foi incubada com agitação a 150 rpm a 37°C. O início da esporulação ou T0 é definido como o final da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária. Para definir T0 é realizada uma curva de crescimento através da medição da DO₆₀₀ a intervalos de 30 min. Dezoito horas após T0 (ou T18) as células foram centrifugadas a 7000xg durante 10 min, a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em ddH₂O e mantido a 4°C durante 24 horas.

2.1.3 Purificação de esporos em gradiente de densidade

Os esporos foram purificados por centrifugação em gradiente de densidade de gastrografina. O material celular mantido em ddH₂O durante 24 horas a 4°C (secção anterior) foi colhido por centrifugação a 7000xg durante 10 min, a 4°C e ressuspenso em 1ml de gastrografina (Bayer ScheringPharma) a 20%. Esta suspensão foi colocada sobre 30 ml de uma solução de gastrografina a 50%. Após centrifugação a 7000xg durante 30 min a 4°C, o sedimento celular (correspondente aos esporos maduros livres) foi lavado em 2 ml de ddH₂O fria e os esporos colhidos por centrifugação a 13000xg, durante 5 min. Esta lavagem foi repetida 5 vezes. Por fim o sedimento foi ressuspenso em

500µl de ddH₂O, e armazenado a -20°C até à sua utilização.

2.1.4 Ensaios de resistência dos esporos ao calor e à lisozima

Seguiu-se o método previamente descrito por Nicholson e Setlow (Nicholson e Setlow,1990). A partir de um pré-inóculo crescido em LB a 37 °C durante 6 horas a 180 rpm, foram inoculados 10 ml de DSM para uma DO₆₀₀ aproximada de 0.05. A cultura foi incubada com agitação a 150 rpm a 37°C. Dezoito horas após o T0, foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁶ em sais B&W (anexo 6) e foram plaqueados 100 µL das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ em caixas de LB agar para determinação do título de células viáveis. Os tubos contendo as diluições apropriadas, estimadas por observação das culturas por microscopia de contraste fase, foram de seguida incubados durante 20 minutos, a 80°C. Foram plaqueados 100 µL de cada diluição em caixas de LB agar e estas incubadas durante a noite a 37°C. A eficiência de esporulação é calculada como a razão entre o número de unidades formadoras de colónias (UFC/ml) resistentes ao calor e o número de UFC/ml viáveis, multiplicado por 100.

Para determinar a resistência dos esporos à lisozima adicionou-se 200 µL de lisozima (10mg/ml) a 1 ml de cultura de esporos, e incubou-se 20 min a 37°C. Centrifugou-se a cultura 5 min a 4000xg e após ressuspensão do sedimento celular em 1ml de sais B&W, realizaram-se diluições seriadas até 10⁻⁶.

Foram plaqueados 100 µL de cada diluição em caixas de LB agar e estas incubadas durante a noite a 37 °C. A resistência à lisozima é calculada como a razão entre o número de unidades formadoras de colónias (UFC/ml) resistentes à lisozima e o número de UFC/ml viáveis, multiplicado por 100.

2.1.5 Determinação da eficiência de germinação

Seguiu-se o método previamente descrito por Nicholson e Setlow (1990). Esporos purificados, tipicamente a uma concentração de 1x10⁹ esporos/ml, foram ativados por aquecimento a 70°C, durante 20 min. Lavou-se os esporos, uma vez, com ddH₂O, e ressuspendeu-se o sedimento celular em solução GFK (anexo 4) de modo a obter um DO a 580nm de 1. A suspensão de esporos foi incubada a 37°C durante 15 min, de seguida adicionou-se L-Asn (100mM) como indutor de germinação e mediu-se a DO a 580nm a cada 10 min durante 1h. A eficiência de germinação é dada pela perda de DO ao longo do tempo.

2.1.6 Microscopia Eletrónica de Transmissão (MET)

Para analisar a morfologia dos esporos através de MET, começou por se fixar esporos purificados em 2 ml de glutaraldeído e paraformaldeído (2,5% e 2%, respetivamente, feitos em tampão fosfato

0,1M (anexo 6). Incubou-se 10 min à temperatura ambiente (TA). De seguida adicionou-se mais 2 ml de fixativo e incubou-se 2 h à TA e por último a 4°C com agitação durante a noite. Após 3 lavagens com tampão fosfato 0,1M (anexo 6) os sedimentos celulares foram embebidos em agarose de ponto de fusão baixo (Omnipur Agarose, marca Calbiochem; 1,5% em FHEM; anexo 1) e mantidos durante 3-5 min a 38°C antes de serem transferidos para o gelo até a solução solidificar. Os sedimentos celulares foram cortados em 6 partes sendo que os cortes maiores foram submersos em tampão fosfato 0,1M antes de serem tratados 1h no gelo com ácido tánico (1% em tampão fosfato 0,1M), seguido de uma lavagem com tampão fosfato 0,1M, duas lavagens com água e mais 60 min no gelo com tetróxido de ósmio (1% em água). Após três lavagens com água, as amostras ficaram 1h em acetato de uranilo (0,5% em água). A desidratação das amostras começou com um ciclo de 10 min/solução com etanol a 30%, 50% e 70% durante a noite, seguido de um segundo ciclo com 20 min de 90% 1 vez, 100% 3 vezes. Fez-se duas lavagens de 10 min com óxido de propileno deixando a amostra com 500 µl do mesmo. Adicionou-se resina (Kit Embed-812 Resin, EMS) lentamente (1h30) até atingir proporção de volume 2:1. Transferiu-se os sedimentos celulares para novos tubos com 1 ml de resina fresca e incubou-se à TA com agitação durante a noite. Adicionou-se novamente às amostras 1 ml de resina fresca durante 2h à TA. As amostras foram colocadas em moldes e incubadas a 60°C até a resina polimerizar (aproximadamente 24h).

Após os cortes terem sido feitos as imagens de MET foram adquiridas com um microscópio (Hitachi, modelo H-7650).

2.2 Técnicas gerais de genética microbiana e de biologia molecular

2.2.1 Extração de DNA plasmídico em pequena escala

A extração de DNA plasmídico de células de *E. coli* para a identificação de clones por perfis de restrição (mini-preparações) foi realizada do seguinte modo. Centrifugou-se 2 ml de uma cultura celular da estirpe desejada em meio LB ($OD_{600} \sim 1.8-2.0$), a 13000xg, 5 min à TA e ressuspendeu-se o sedimento em 360 µl de tampão STET (anexo 6). Adicionou-se 0,6 mg/ml lisozima e 0,25 mg/ml de RNAase A, incubando-se a 37°C durante 15 min. Ferveu-se a amostra a 100°C, 1 min, centrifugando-se de seguida a 13000xg, à TA, durante 15 min. Removeu-se o sedimento e adicionou-se ao sobrenante isopropanol na proporção de 0,7X. Procedeu-se a nova centrifugação durante 30 min a 4°C, 13000xg, de modo a precipitar o DNA. Desprezou-se o sobrenadante, secou-se o sedimento de DNA plasmídico e ressuspendeu-se em 20 µl de ddH₂O. Os DNAs extraídos foram conservados a -20°C.

2.2.2 Extração e purificação de DNA plasmídico por troca iônica

Este processo foi feito com recurso ao kit ZR Plasmid Miniprep - *Classic* (Zymo Research) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O método baseia-se na lise alcalina das células e na adsorção do DNA, na presença de sal, a uma matriz de sílica incorporada numa coluna. A pureza, qualidade e concentração do material é a ideal para experiências de transformação genética, restrição enzimática, clonagem e sequenciação de DNA.

2.2.3 Extração do DNA genómico de *B. subtilis*

Cresceu-se *B. subtilis* em 5 ml de meio líquido LB, durante a noite com uma agitação orbital de 100-120 rpm, a 37 °C. Foram centrifugados 4 ml de cultura durante 10 min, a 13000xg, à TA, e o sedimento celular ressuspendido em 500 µL de tampão SET (ver o anexo 6). De seguida foram adicionados 0,5 mg/ml de lisozima e 0,05 mg/ml RNase A, incubando-se a 37°C, durante 15 min. Adicionou-se 12,5 µL de 10% Sarcosyl e 0,03 mg/ml de Proteinase K e incubou-se novamente a 37°C durante 15 min. Adiciona-se 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agita-se até ficar uma suspensão homogênia. Centrifuga-se a 13000xg durante 10 min, à TA. A fase aquosa é recuperada para um novo tubo sendo adicionado 500 µl de clorofórmio, e a mistura agitada por inversão até à homogeneidade. Centrifugou-se novamente a 13000xg, à temperatura ambiente e recupera-se a fase aquosa contendo o DNA. A fase aquosa foi dialisada contra ddH₂O. O DNA extraído foi conservado a 4°C.

2.2.4 Preparação e transformação de células competentes de *E. coli*

Para a indução da competência de células de *E. coli* DH5α e BL21 inoculou-se uma colónia isolada em 50 ml de LB e incubou-se a 37°C, 120 rpm num agitador orbital, até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi depois centrifugada durante 2 min, a 4 °C e a 7000xg. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi ressuspendido com 25 ml de uma solução de 0,1 M CaCl₂, mantido no gelo. As células foram incubadas em gelo durante cerca de 1h, e novamente centrifugadas nas condições anteriores. O sedimento celular foi ressuspendido em 3,3 ml de CaCl₂ e 15% de Glicerol, sendo depois distribuído em alíquotas de 150 µl que foram armazenadas a -80°C até à sua utilização.

Para a transformação das células, incubou-se 150 µl da suspensão de células competentes com 1 µl de DNA plasmídico (cerca de 1 µg), durante 1h em gelo. As células foram depois sujeitas a um choque térmico a 42°C em banho-maria, durante 90 segundos seguido de incubação em gelo durante 2

min. De seguida, foi adicionado 1 ml de LB, previamente equilibrado a 37°C, e a suspensão de células foi incubada durante 1h, a 37°C e 200 rpm. Centrifugou-se então a cultura durante 2 min a 6000xg, sendo o sedimento celular ressuspensionado em 150 µl do sobrenadante. As células foram plaqueadas em placas de LB agar contendo os antibióticos adequados, e incubadas a 37°C durante a noite.

2.2.5 Preparação de células competentes de *B. subtilis* e a sua transformação

Para induzir a competência de células de *B. subtilis*, inoculou-se uma colónia isolada da estirpe em estudo em 5 ml de meio de crescimento 1 (GM1; ver o anexo 4) e a cultura foi incubada a 37°C, e a 200 rpm. 90 min após o final da fase de crescimento exponencial nestas condições (ou T₀), diluiu-se a cultura 1:5 em 4 ml de meio de crescimento 2 (GM2; ver o anexo 4), e incubou-se durante 2h a 37°C com agitação de 200 rpm. No final deste período, as células competentes foram transformadas por adição de 10 µl do DNA (cerca de 10 µg). A mistura foi incubada durante 1h, a 200 rpm e a 37°C. Foram plaqueados 200 µl da suspensão celular em caixas de LB agar com os antibióticos adequados. As caixas foram incubadas a 37°C durante a noite.

2.2.6 Eletroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose

As amostras de DNA foram sujeitas a eletroforese em géis de 1-2% de agarose em tampão TAE 1X (anexo 6), dependendo da gama de tamanhos moleculares a resolver. Os géis foram corridos na presença de brometo de etídeo, a uma concentração de 0,001% (v/v). Antes da aplicação no gel, foram adicionados 5 µl de tampão laranja G (anexo 6) a cada amostra. Os géis foram corridos a uma voltagem constante de 100 V, e o DNA visualizado sob radiação UV de baixo comprimento de onda (205 nm). O marcador de peso molecular utilizado para inferir o peso molecular dos fragmentos de DNA foi o *1 Kb plus DNA Ladder* (Gibco, BRL).

2.2.7 Manipulações enzimáticas do DNA

Todas as manipulações enzimáticas do DNA durante procedimentos de clonagem molecular foram realizadas de acordo com os métodos gerais descritos por Sambrook *et al.* (Sambrook, 2001) Para a realização das reações de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada a polimerase do DNA Phusion (Finnzymes; obtida de Thermo Fisher Scientific Inc.), segundo as instruções do fabricante.

2.2.8 Extração das proteínas do manto do esporo

2.2.8.1 Extração SDS-DTT

A determinação da quantidade de esporos purificados a aplicar no poço de um gel de acrilamida (ver SDS-PAGE, abaixo) foi obtida por leitura da DO a 580 nm da suspensão de esporos previamente diluída 1:200 em 1ml de ddH₂O, e por recurso à equação seguinte:

$$\mu l/poço = \frac{3600}{Ab_{580} \times 200}$$

Para extrair as proteínas do manto dos esporos adicionou-se ao volume determinado da suspensão de esporos purificados, igual volume de tampão de amostra dos esporos 2X (ver tabela 6.6). A mistura ferveu-se durante 8 min.

2.2.8.2 Extração alcalina

A quantidade de esporos utilizada foi determinada como descrito acima (2.2.8.1). A extração alcalina foi realizada com a adição de NaOH (0,1M) aos sedimentos celulares de esporos purificados (centrifugados 2 min, 13000xg a TA) e deixados no gelo, 15 min (agitando os tubos regularmente). Após nova centrifugação (2 min, 13000xg a TA) neutralizou-se o sobrenadante com HCl (0,1M).

2.2.9 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida contendo SDS (ou SDS-PAGE), foi efectuada de acordo com o sistema de tampões de Laemmli (Laemmli, 1970). O marcador de peso molecular utilizado para inferir o peso molecular das proteínas foi o *Precision Plus Protein Pre-stained Standards All Blue* (Bio-Rad).

Após separação eletroforética, e dependendo do objectivo, os géis foram corados ou utilizados para detecção imunológica de proteínas. A coloração dos géis foi realizada numa solução com 50% (v/v) de Etanol, 10% (v/v) de ácido acético e 0,1% de azul de Coomassie R-250, durante 30 min. De seguida foram descorados com uma solução de 30% (v/v) de Etanol e 10% (v/v) de ácido acético, e digitalizado o resultado.

2.2.10 Detecção imunológica de proteínas imobilizadas

Para a detecção imunológica as proteínas resolvidas por SDS-PAGE foram electro-transferidas para membranas de nitrocelulose, na presença de tampão de transferência (anexo 6) durante 90 min, a uma diferença de potencial constante de 100V. Após a transferência, a membrana foi incubada durante 1 h, com agitação orbital, em 50 ml de solução de bloqueio (anexo 6), e lavadas em 10 ml de solução de lavagem (anexo 6). De seguida, as membranas foram incubadas a 4°C durante a noite, em solução de anticorpo (anexo 6) na presença dos anticorpos contra grupos fosforil ligados a serinas ou contra as proteínas CotB, CotG e CotH, empregues uma diluição final de 1:200, 1:300, 1:1000 e 1:150 respetivamente. Após três lavagens em 10 ml de solução de lavagem (ver o anexo 6), as membranas foram incubadas durante 30 min com agitação orbital e à TA, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à enzima *Horseradish peroxidase* (HRP, Sigma), diluído de 1:10000 em 10 ml de solução de anticorpo (anexo 6). Após três novas lavagens de 10 min cada, a detecção dos antígenos proteicos foi realizada por incubação em 2 ml de solução de detecção (SuperSignal west Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) segundo as instruções dos fabricantes, seguida de exposição das membranas a um filme de auto-radiografia (Hyperfilm, GE Healthcare), numa cassette de revelação. Os tempos de exposição variaram entre 30 s e 5 min. As chapas foram depois reveladas em solução de revelação e de fixação (Kodak).

2.2.11 Super-produção e purificação de proteínas recombinantes

As estirpes derivadas de BL21(DE3) contendo os plasmídeos para a produção de CotB, CotG, CotH^{wt} e CotH^{D228Q} foram crescidas em meio de auto-indução (tabela 6.4) durante 17,5 h a 37°C com agitação de 200 rpm. De seguida, as células foram colhidas por centrifugação (7000xg, durante 10 min a 4°C). Em casos particulares as células foram ressuspensas em tampão VEPEX-100 (anexo 6).

CotH^{wt}-*Strep-tag* e CotH^{D228Q}-*Strep-tag*: as células colhidas por centrifugação foram ressuspensas em 2 ml de tampão W (ver anexo 6) contendo 100 mM de PMSF. As células foram lisadas a 9 000 psi numa Prensa de French e o extrato foi centrifugado durante 10 minutos à TA a 13000xg. Aplicou-se o sobrenadante do extrato celular clarificado por centrifugação a uma coluna de 1ml de *Strep-Tactin Sepharose* (IBA) pré-equilibrada com 5 ml de tampão W. A coluna foi lavada com 5 ml de tampão W e de seguida a proteína foi eluída com 3 ml de tampão E (tampão W com 2.5mM Destibiotina). A proteína presente nas fracções eluídas foi quantificada pelo método pelo método de Bradford (Bio-Rad). Adicionou-se 20% glicerol às fracções recolhidas (0,5 ml), que foram conservadas a -20°C até à sua utilização.

CotB-His₆: após indução, o sedimento celular colhido por centrifugação foi ressuspendido em 1 ml de tampão *Start* (anexo 6), contendo 100 mM de PMSF. As células foram lisadas numa Prensa de

French a 9 000 psi e o extrato foi centrifugado durante 10 minutos à temperatura ambiente a 13 000xg. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento foi ressuspendido no mesmo volume de tampão de *Start* contendo 8M de ureia, e a proteína solubilizada durante 60 minutos com agitação. Centrifugou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente a 13 000xg. Uma coluna de 1 ml de Ni²⁺-ácido nitrilotriacético conjugado a agarose (NTA *Agarose*, Qiagen) foi equilibrada com 10 ml de tampão *Start* contendo 8 M de ureia (ver anexo 6), e o sobrenadante, clarificado por centrifugação, foi então aplicado. A coluna foi depois lavada em tampão *Start* contendo concentrações decrescentes de ureia (ver anexo 6). A proteína foi então eluída sequencialmente com 5ml de tampão *Start* com concentrações crescentes de imidazol (40mM, 100mM, 300mM e 500mM). A proteína presente em cada fração foi quantificada pelo método do biureto (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). As fracções de 1ml foram mantidas a -20°C com 20% glicerol até à sua utilização.

2.3 Técnicas bioquímicas

2.3.1 Desfosforilação de proteínas

A desfosforilação das proteínas foi efectuada por ação da enzima FastAP (0,1U/μl, Fermentas), em tampão Fosfatase Alcalina (ver anexo 6) a 37°C durante 60 min.

2.3.2 Ensaio de fosforilação *in vitro* com [γ ³²P]ATP

As amostras (volume total 20 μl) com as cinases purificadas (0,5-1 μM) e/ou o substrato (2 μM) foram incubadas com 0,1mM de ATP-frio e 1 μCi de [γ ³²P]ATP em Tampão de fosforilação 1X (anexo 6) 5, 10 min e 30 min, a 37°C. Para inibição da auto-fosforilação foram adicionadas às amostras diferentes concentrações de staurosporina (Sigma) (7μM; 70μM e 700μM), antes da adição de ATP.

As reacções foram interrompidas por adição de tampão de amostra 10X (1:10), e resolvidas por SDS-PAGE. Os géis ou foram corados com coomassie (e neste caso as amostras apenas continham ATP-frio) ou foram secos, seguidos de exposição a um filme de auto-radiografia (Hyperfilm, GE Healthcare), numa cassete de revelação, durante a noite a -80°C. As chapas foram reveladas em solução de revelação e de fixação (Kodak).

3. Resultados

3.1 CotB é uma proteínas fosforilada do manto do esporo de *B. subtilis*

Trabalho prévio realizado no laboratório mostrou que a modificação pós-traducional de CotB ocorre em *E. coli* na presença de CotH e CotG, i.e., a expressão de CotB sozinho em *E. coli* leva à produção da forma CotB-46 (Zilhão *et al.*, 2004). Como descrito anteriormente, CotH é um homólogo estrutural de cinases Ser/Thr. Dado a semelhança estrutural e a função morfogenética deste na correta montagem de CotB no manto, pareceu-nos importante determinar se a modificação pós-traducional de que CotB é alvo *in vivo* seria uma fosforilação e se CotH seria necessário para essa modificação. A estirpe selvagem MB24, e as estirpes mutantes *cotB*, *cotG* e *cotH*, usadas neste estudo como controlo, foram crescidas durante 24 horas em meio que permite esporulação. Os esporos produzidos pelas referidas estirpes foram purificados e realizou-se uma extração alcalina das proteínas do manto. No caso das proteínas extraídas da estirpe selvagem foram posteriormente sujeitas a tratamento com fosfatase alcalina. As proteínas foram então analisadas por SDS-PAGE seguido de detecção imunológica de proteínas imobilizadas utilizando um anticorpo que reconhece CotB (figura 3.1 painel B), grupos fosforil ligados a serinas (anti-Pser) (painel C), e CotG (painel D).

Na análise dos extratos com um anticorpo anti-CotB, foi detetado como esperado, uma proteína de 66 kDa em extratos de MB24 sem tratamento com fosfatase alcalina (figura 3.1 B). Uma forma de 46 kDa é detetada nos extratos sujeitos a fosfatase alcalina e em extratos do mutante *cotG* (figura 3.1 B). No mutante *cotB* nenhuma das formas é detetada. Seria de esperar a detecção da forma CotB-46 no mutante *cotH* (Zilhão *et al.*, 2004). No entanto não detetamos qualquer proteína neste mutante usando o anticorpo anti-CotB. Isto poderá ser justificado pelo uso neste trabalho de um método de extração diferente do usado nos estudos anteriores (Zilhão *et al.*, 2004). No extrato da estirpe selvagem não tratado com fosfatase alcalina, uma proteína de 66 kDa é reconhecida pelo anticorpo anti-Pser (figura 3.1 C). Nas amostras sujeitas a tratamento com fosfatase, é de notar o desaparecimento da proteína de 66 kDa. Adicionalmente esta banda não está presente nas proteínas extraídas de esporos do mutante *cotB*, *cotG* ou *cotH*. Estas observações sugerem fortemente que a proteína de 66 kDa fosforilada detetada pelo anticorpo anti-Pser no extrato de proteínas extraídas do esporo selvagem é CotB.

A análise dos extratos com anti-CotG sugere que a proteína CotG também é fosforilada, já que as formas de CotG entre os 30 e os 37 kDa detetadas na estirpe selvagem desaparecem quando esta é sujeita a fosfatase alcalina (figura 3.1 D). É ainda de referir que, tal como descrito anteriormente, CotH desempenha um papel na estabilidade de CotG, não sendo possível detetar CotG no mutante *cotH* (figura 3.1 D). O facto do anticorpo anti-Pser não detetar estas formas poderá indicar um nível de fosforilação inferior a CotB.

Esta análise sugere que a modificação pós-traducional de que CotB é alvo *in vivo* é uma

fosforilação e que CotH e CotG são necessários para que essa fosforilação ocorra.

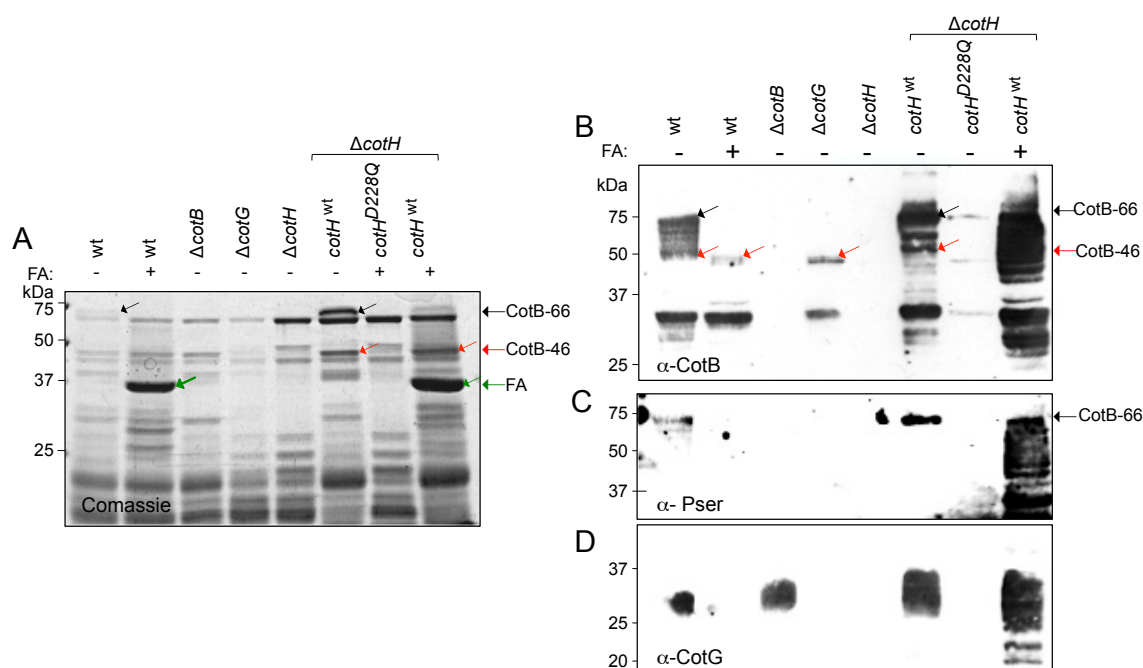


Figura 3.1- Tratamento, com fosfatase, de proteínas extraídas do manto do esporo. Foram utilizadas as estirpes selvagem MB24 e as estirpes mutante $\Delta cotB$ (AH4095), $\Delta cotG$ (AH4106), $\Delta cotH$ (AH4094), $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ (AH4098) e a estirpe $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH9097); As estirpes indicadas foram inoculadas em meio DSM, para indução da esporulação e após 24h foram recolhidas amostras. Os esporos foram purificados e as proteínas do manto do esporo foram sujeitas a extração alcalina. As proteínas da estirpe selvagem e $\Delta cotH/cotH^{wt}$ sofreram desfosforilação por tratamento com fosfatase alcalina (FA). As proteínas foram analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração com coomassie (A) ou seguido de detecção imunológica de proteínas imobilizadas (B,C,D). Para a detecção imunológica proteica foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CotB (Painel B), anti-Pser (Panel C) ou anti-CotG (Painel D). A posição das proteínas CotB-66, CotB-46 e fosfatase alcalina (FA) está indicada por uma seta a preto, vermelho e verde, respetivamente, do lado direito das respetivas amostras. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis.

3.2 Construção do mutante pontual CotH^{D228Q}

CotH apresenta uma homologia estrutural com cinases Ser/Thr e possui um centro ativo conservado (figura 1.5 A e B). A importância funcional do resíduo de aspartato na posição 228 (D228) é sugerida pela sua localização no modelo estrutural de CotH (Figura 1.5 B) e pelo facto de num alinhamento da sequência de aminoácidos do centro ativo com as cinases homólogas, este ser um dos resíduos conservados (Figura 1.5 A). Resultados preliminares do laboratório, onde o resíduo D228 de CotH foi substituído por uma glutamina e a proteína alterada super-produzida, em *E. coli*, sugerem que esta forma da proteína não é capaz de modificar pós-traducionalmente CotB, sugerindo perda de

atividade enzimática (Figura 1.6 A, B e C). De modo a estudar o impacto dessa mesma mutação na formação do esporo, o alelo *cotH*^{D228Q} foi introduzido em *B. subtilis*.

Um estudo recente revelou que em *B. subtilis*, o gene *cotH* encontra-se sobre o controle de duas regiões promotoras, sendo que o gene *cotG* se encontra entre as duas regiões (ver figura 1.3 A, B e C; Giglio et al., 2011).

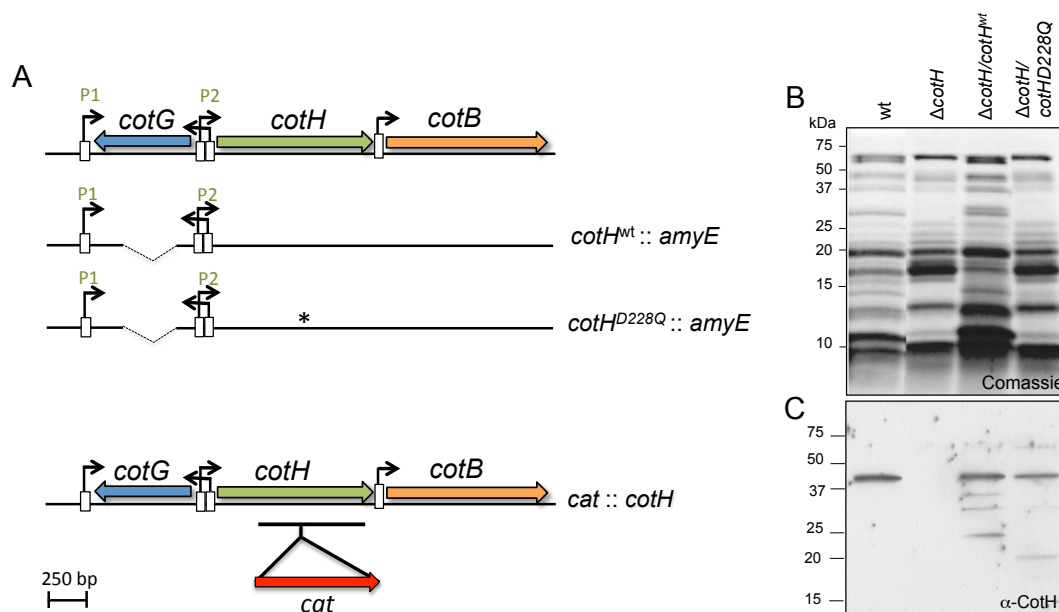


Figura 3.2 - Construção e caracterização do mutante pontual CotH^{D228Q} A) Representação esquemática da região de *cotG-cotH* construída de modo a incluir os dois promotores de *cotH*, sem incluir o gene *cotG*. As caixas brancas representam as regiões promotoras e as setas indicam o sentido da transcrição. Recorreu-se a SOE-PCR, para eliminar parte do gene *cotG* (cerca de 270 pb), para que este não ficasse em duplicado no cromossoma. Utilizou-se como molde essa construção de PCR para introduzir a mutação pontual do resíduo 288, ácido aspártico (D), para glutamina (Q) representada por um asterisco (*). Cada região foi inserida no gene *amyE* de um estirpe de eliminação de *cotH* representada em último, dando origem a AH4097 e AH4098. O gene *cat*, que foi inserido no gene *cotH*, é o gene de marca resistência para o cloranfenicol. B e C) Extração alcalina das proteínas do manto do esporo. Foram utilizadas a estirpe selvagem MB24, as estirpes mutantes $\Delta cotH$ (AH4094) e $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ (AH4098) e a estirpe $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH4097); As estirpes indicadas foram inoculadas em meio DSM, para indução da esporulação. Foram recolhidas amostras após 24h horas do início da esporulação. Os esporos foram purificados e as proteínas do manto do esporo foram sujeitas a extração alcalina. As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE seguido de coloração com azul de coomassie (B) ou seguido por detecção imunológica de proteínas imobilizadas (C). Para a detecção imunológica foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CotH. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis.

O promotor 1 (P1, figura 1.3B) dá origem a um mRNA longo, no entanto a extremidade 5' deste mRNA não é necessária ao controlo da expressão de CotH. A expressão ectópica de *cotH* no locus *amyE* pode então ser conseguida através da fusão de ambos os promotores, eliminando a região que codifica para CotG (figura 3.2 A). A fusão de P1 com P2 e com a região codificante de *cotH* foi feita por SOE-PCR usando como molde DNA genómico de *B. subtilis*. P1 foi amplificado por PCR utilizando os primers cotH95D/cotGcotHR, P2 e a região codificante de *cotH* foi amplificada usando os primers cotGcotHD/cotH2140R (tabela 6.3). Os dois fragmentos foram fundidos por SOE-PCR

utilizando os *primers* cotH95D/cotH2140R. Para a inserção desta região no locus *amyE* utilizou-se o plasmídeo pCD6 (anexo 2), que se obteve através da digestão do vetor pMLK83 (*stock* do laboratório; Karow e Piggot, 1995) com a enzima EcoRI (Fermentas), para eliminação do gene *gusA*. O fragmento resultante de SOE-PCR com 1778pb foi digerido com as enzimas SalI (Fermentas) e HindIII (Fermentas), para inserção em pCD6, digerido com as mesmas enzimas, originando pCD7 (tabela 6.2), tendo sido confirmado por sequenciação. A estirpe de *B. subtilis* com uma mutação de eliminação do gene *cotH* (AH4094, tabela 6.1), foi transformada com pCD7, originando a estirpe AH4097 ($\Delta cotH/cotH^{wt}$) (figura 3.2 A). Os *primers* cotHD228Q_R e cotHD228Q_D foram utilizados para converter o codão 228 de *cotH* num codão para glutamina por PCR originando pCD8 (anexo 2), cuja sequência de DNA foi confirmada por sequenciação. O plasmídeo foi usado para transformar o mutante *cotH* (AH4094), originando a estirpe AH4098 ($\Delta cotH/cotH^{D228Q}$) (figura 3.2 A).

3.3 Acumulação do mutante CotH^{D228Q} nos esporos de *B. subtilis*

Antes de prosseguir com a investigação sobre o papel de CotH na montagem do manto do esporo foi necessário verificar se a proteína CotH quando produzida no locus *amyE* acumula corretamente nos esporos. Como tal, as estirpes selvagem (MB24, usada como controlo positivo), AH4097 ($\Delta cotH/cotH^{wt}$) e estirpes mutantes AH4098 ($\Delta cotH/cotH^{D228Q}$) e AH4093 ($\Delta cotH$, usada como controlo negativo), foram crescidas durante 24 horas em meio que permite esporulação. Os esporos produzidos pelas referidas estirpes foram purificados e realizou-se uma extração alcalina das proteínas do manto.

As proteínas foram então analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração com azul de coomassie ou seguido de deteção imunológica de proteínas imobilizadas, utilizando um anticorpo que reconhece CotH. Na figura 3.2 B é possível verificar que a estirpe de complementação, com *cotH^{wt}* inserido no locus *amyE*, tem um padrão de proteínas do manto semelhante à estirpe selvagem, MB24, enquanto que estirpe com produção de CotH com mutação de substituição tem um fenótipo semelhante à estirpe sem produção de CotH. Podemos observar que numa estirpe sem CotH ou com CotH^{D228Q} muitas proteínas deixam de fazer parte da estrutura do manto do esporo. Estas observações estão de acordo com resultados anteriores onde se mostra que CotH é uma proteína morfogenética (Naclerio *et al.*, 1996).

Na análise dos extratos com um anticorpo anti-CotH (figura 3.2 C), foi detetada, nas amostras da estirpe selvagem, estirpe de complementação e mutante pontual, uma proteína com o tamanho esperado de 42 kDa. Esta proteína não é detetada no mutante insercional de *cotH*. Na estirpe de complementação, o aparecimento de 3 bandas de fraca intensidade, abaixo dos 37 kDa, sugere a produção aumentada da proteína CotH. Esta análise sugere que CotH^{wt} e CotH^{D228Q} acumulam e são corretamente montados no manto do esporo.

3.4 Caracterização fenotípica: resistência ao calor, lisozima, eficiência de germinação e recrutamento das proteínas para o manto do esporo

Um mutante nulo de *cotH* é citado na literatura como não tendo fenótipo para a resistência ao calor nem para a resistência à lisozima (Naclerio *et al.*, 1996). Como tal, fomos testar se a nossa estirpe com mutação de substituição em *cotH* se comportava do mesmo modo, nos dois ensaios. Utilizamos culturas de 24h em DSM das duas estirpes construídas neste trabalho, $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ e $\Delta cotH/cotH^{wt}$ assim como da estirpe selvagem e do mutante *cotH* de eliminação. Verificamos que a eficiência de esporulação e a resistência a esta enzima lítica não é afetada na estirpe com a mutação pontual nem com a mutação de eliminação de *cotH* (resultados não apresentados).

Para analisar o fenótipo das proteínas do manto das estirpes selvagem, da estirpe de complementação $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH4097) e das estirpes mutantes $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ (AH4098), $\Delta cotH$ (AH4094), $\Delta cotB$ (AH4095) e $\Delta cotG$ (AH4106), induzimos esporulação nestas estirpes durante 24h e após purificados os esporos, extraímos as proteínas do manto pelo método de SDS-DTT.

Como podemos verificar no gel resolvido por SDS-PAGE e corado com coomassie (figura 3.3 A) a estirpe com mutação pontual em *cotH* tem um fenótipo semelhante à estirpe mutante insercional de *cotH*, enquanto que a estirpe de complementação tem fenótipo semelhante à estirpe selvagem. A estirpe mutante para *cotB* apenas difere do fenótipo selvagem numa banda de 66 kDa (Naclerio *et al.*, 1996). No entanto a ausência dessa banda, neste gel, é difícil de avaliar (figura 3.3 A). Tal pode dever-se a CotA, uma proteína do manto externo com migração eletroforética muito semelhante à de CotB e presente nos mutantes *cotB*, *cotG* e *cotH* (Zilhão *et al.*, 2004). Já no caso das estirpes mutantes *cotG*, *cotH* e $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ é visível a ausência de coloração proteica abaixo dos 37 kDa, correspondente a CotG. Este resultado reforça a ideia de que a ausência de CotH leva à ausência de CotG no manto (Naclerio *et al.*, 1996). Além disso a análise das estirpes de *cotH* e $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ confirma o efeito pleiotrópico de CotH, sendo detetável não só o desaparecimento de CotG, como de inúmeras proteínas presentes na superfície do esporo, tal como descrito anteriormente (Naclerio *et al.*, 1996).

Para testar a importância de CotH para mais uma das propriedades funcionais do esporo, fomos analisar os níveis de germinação de esporos purificados em resposta a asparagina (em meio GFK-Asn), das estirpes mutantes $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ e $\Delta cotH$ e das estirpes selvagem e de complementação ($\Delta cotH/cotH^{wt}$), como controlo. Durante a germinação os esporos perdem o seu aspecto refrátil levando a uma menor absorvância. Assim, quanto menor o valor de absorvância registado, maior terá sido o número de esporos germinados. Como se pode observar na figura 3.3 B, as estirpes mutantes $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ (a roxo) e $\Delta cotH$ (a laranja) possuem um fenótipo idêntico, com níveis de germinação menores que as estirpes de complementação (a verde) e selvagem (a azul) (que por sua vez, possuem um fenótipo semelhante entre si). Esta deficiência de germinação num mutante de eliminação de *cotH* já tinha sido registada em estudos anteriores (Naclerio *et al.*, 1996).

Estes resultados sugerem que o alelo *cotHD228Q* dá origem a uma proteína não funcional, mas que é recrutada para o manto do esporo.

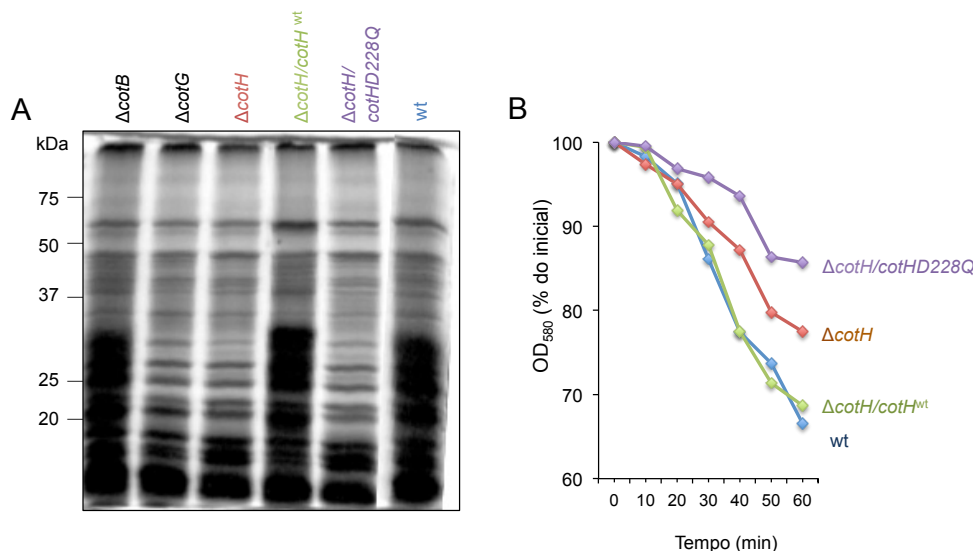


Figura 3.3 - Extração por SDS-DTT das proteínas do manto do esporo e eficiência de germinação. A) Foram utilizadas a estirpe selvagem MB24 (a azul), a estirpe $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH4097, a verde) e as estirpes mutantes $\Delta cotH/cotHD228Q$ (AH4098 a roxo), $\Delta cotH$ (AH4094 a laranja), $\Delta cotG$ (AH4106) e $\Delta cotB$ (AH4095). As estirpes indicadas foram inoculadas em meio DSM e após 24h horas do início da esporulação foram recolhidas amostras de esporos para serem purificados. Para extração das proteínas da superfície do esporo, as amostras de esporos purificados foram submetidas a 100°C durante 8 min na presença de tampão de amostra dos esporos 2X (ver tabela 6.6). As proteínas foram analisadas por eletroforese em géis de SDS-PAGE seguido de coloração com azul de coomassie. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo do painel. B) A germinação dos esporos purificados das estirpe MB24, $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH4097), $\Delta cotH/cotHD228Q$ (AH4098) e $\Delta cotH$ (AH4093) foi induzida por adição de 100mM de L-asparagina ao meio GFK. Mediu-se a DO_{580nm} em intervalos de 10 min, durante 1h. Quanto menor o valor de DO₅₈₀ registado, maior o número de esporos que germinaram. Os valores resultam da média de três experiências independentes. A variação entre experiências foi menos de 10%.

3.5 Efeito de CotH^{D228Q} na correta montagem de CotB no manto

O passo seguinte foi testarmos a ação de CotH^{D228Q} na fosforilação de CotB *in vivo*. Para tal, procedemos à desfosforilação das proteínas do manto de esporos purificados, da estirpe selvagem e da estirpe $\Delta cotH/cotH^{wt}$ por ação da fosfatase alcalina. Além destas duas estirpes foram utilizados extratos proteicos de esporos mutantes de eliminação de *cotB*, de *cotG*, de *cotH* e $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$. Os extratos foram resolvidos por SDS-PAGE seguidos ou de coloração com coomassie (figura 3.1 A) ou de deteção imunológica das proteínas imobilizadas, utilizando um anticorpo anti-CotB (figura 3.1, painel B), anti-Pser (painel C) e anti-CotG (painel D).

Tal como referido anteriormente na figura 3.1 A a banda de 66 kDa não é visível nas amostras tratadas com fosfatase alcalina, assim como no mutante *cotB*, *cotG* e mutantes *cotH*. Na amostra de $\Delta cotG$ e $\Delta cotH$ é de notar a ausência de CotG (banda entre os 30 e os 37 kDa). Apesar das estirpes selvagem e de complementação possuírem um fenótipo semelhante, a banda de CotB-66 mostra maior

intensidade na estirpe de complementação. Tal poderá dever-se a uma produção de CotH ligeiramente maior na estirpe de complementação relativamente à estirpe selvagem (ver figura 3.1 A).

Na análise dos extratos com anti-CotB (ver figura 3.1 B), foi detetado uma proteína de 66 kDa em extratos da estirpe selvagem e da estirpe de complementação, sem tratamento com fosfatase alcalina, como seria de esperar. No entanto, o mesmo não foi detetado nos extratos sujeitos a fosfatase alcalina nem nos extratos dos mutantes *cotB*, *cotG* e *cotH*. Na estirpe de complementação $\Delta cotH/cotH^{wt}$ tratada com fosfatase, a desfosforilação parece não ter sido total, aparecendo bandas acima dos 46 kDa. A forma de CotB desfosforilado, de cerca 46 kDa, é visível na amostra submetida à ação da fosfatase, assim como no mutante *cotG*.

Quando a análise dos extratos descritos anteriormente se repetiu com um anticorpo anti-pSer (figura 3.1 C) detetou-se novamente uma banda de 66 kDa apenas no extrato selvagem e no extrato da estirpe de complementação, reforçando a necessidade quer de CotG quer de CotH na fosforilação de CotB. Mais uma vez, a deteção de um arrastamento de bandas na amostra da estirpe de complementação, tratada com fosfatase alcalina, denuncia ineficácia na ação da enzima na presença de uma quantidade maior de CotH. Seria de esperar o surgimento de uma banda com 37 kDa, correspondente a auto-fosforilação de CotH, caraterístico das cinases (Pereira *et al.*, 2011). Provavelmente, a concentração da proteína *in vivo* é demasiado baixa para ser detetada pelo anticorpo anti-Pser, menos sensível.

Esta análise sugere que a atividade de cinase de CotH assim como a presença de CotG são condições necessárias para que CotB sofra a sua modificação pós-traducional, *in vivo*, dando origem à sua forma de CotB-66.

3.6 Mutação pontual de CotH e mutação de eliminação de CotB afetam a correta morfogénese do manto do esporo

De modo a investigar em mais pormenor a influência da ausência da proteína CotH ou da ausência da sua atividade na morfologia dos esporos de *B. subtilis*, recorremos ao método de microscopia eletrónica de transmissão. Através deste método, fomos também analisar a importância de CotB na correta montagem do manto, estrutura essencial para a integridade do esporo.

As amostras de esporos, induzidas 24h em meio DSM, das estirpes MB24, $\Delta cotH/cotH^{wt}$, $\Delta cotH$, $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ e $\Delta cotB$ foram purificadas e processadas como descrito anteriormente. Observando as imagens de cortes transversais dos esporos, presentes na figura 3.4, podemos concluir que enquanto as estirpes selvagem e $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (painéis A e B, respetivamente) apresentam uma correta morfologia do manto externo e interno, partilhando o mesmo fenótipo, a estirpe sem *cotH* (C) apresenta um fenótipo semelhante ao da estirpe com produção de $\Delta cotH/cotH^{D228Q}$ (D), em que toda a estrutura do manto externo se apresenta afetada.

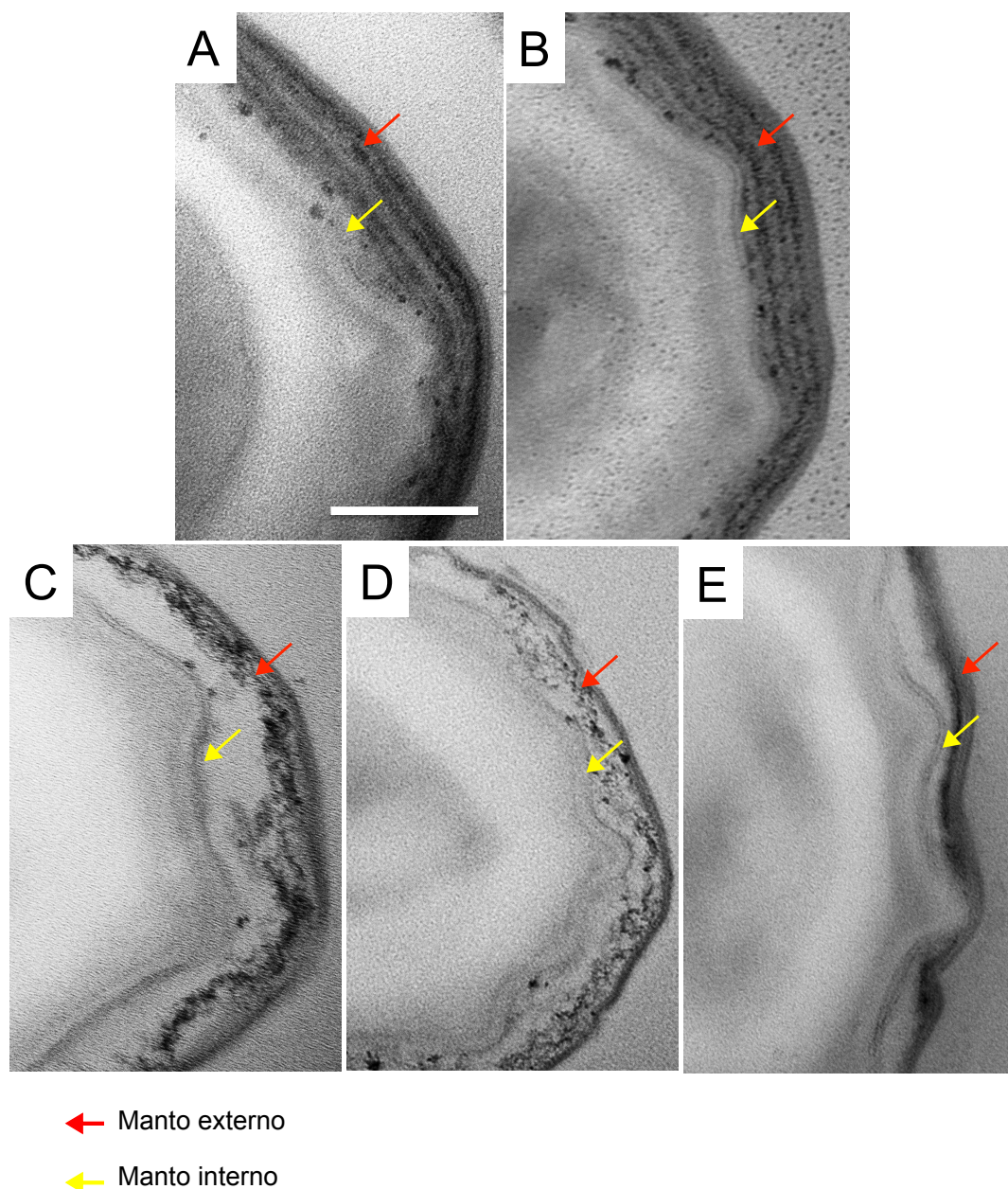


Figura 3.4 - Mutação pontual para a glutamina no centro ativo de CotH e mutações de eliminação de *cotH* ou de *cotB* afetam a morfogênese do manto. Foram utilizadas a estirpe selvagem MB24 (painel A), a estirpe de complementação $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (AH4097) (painel B), as estirpes mutantes $\Delta cotH$ (AH4094) (painel C), $\Delta cotH/cotHD228Q$ (AH4098) (painel D) e $\Delta cotB$ (AH4095) (painel E). As estirpes indicadas foram inoculadas em meio DSM, para indução da esporulação. Após recolha das amostras, induzidas durante 24h, os esporos foram purificados e fixados em glutaraldeído e paraformaldeído. Após 3 lavagens com tampão fosfato 0,1M os sedimentos celulares foram embebidos em agarose de ponto de fusão baixo para poderem ser cortados em partes. Os cortes foram processados com ácido tânico, tetróxido de ósmio e acetato de urânio. As amostras foram desidratadas em solução de etanol em concentrações crescentes, dos 30% aos 100%. Fez-se duas lavagens com óxido de propileno antes de se adicionar a resina fresca. Após infiltração das amostras ficar completa estas foram colocadas em moldes e incubadas a 60°C. Com a resina polimerizada foram feitos os cortes e recolhidas as imagens no microscópio eletrónico de transmissão. A barra representa 0,2 μm .

Observamos uma desorganização das proteínas do manto externo que leva ao desaparecimento do padrão lamelar e da estrutura eletrodensa, caraterísticos desta camada do esporo de *B. subtilis* (painéis

A, B; Henriques & Moran, 2007). A estrutura do manto interno parece não ser tão afetada, sendo visível nas imagens C e D a formação de lamelas idênticas à da estirpe selvagem (A, Zilhão *et al.*, 1999) e $\Delta cotH/cotH^{wt}$ (B). No entanto, é de referir que nas estirpes mutantes de *cotH*, os mantos interno e externo não parecem estar estreitamente associados, como é visível na estirpe selvagem (A, B, Zilhão *et al.*, 1999). Estas considerações estão de acordo com análises de imagens de MET de estudos anteriores, cuja eliminação de CotH levou a alterações visíveis na estrutura do manto (Zilhão *et al.*, 1999).

A análise do painel E demonstra que a ausência de CotB leva a uma alteração de estrutura externa do manto que fica reduzida a menos de metade do espessamento típico numa estirpe selvagem (painel A). Também neste mutante, a alteração da estrutura do manto interno parece não ser tão severa, sendo detetadas as estruturas laminares.

Concluiu-se que tanto CotH como CotB possuem um papel importante na correta morfogénese do manto do esporo. Com toda a análise realizada a $\Delta cotH$ e $\Delta cotH/cotHD228Q$ verificamos que a mutação pontual de *cotH* no resíduo 228 do seu centro ativo, corresponde à perda de função e atividade da proteína, designando-se assim de mutação com perda de função. Sendo esta mutação no centro ativo de CotH, parece indicar que atividade de cinase de CotH é essencial para o seu papel na montagem do manto do esporo.

3.7 Construção de CotH-Strep-tag

Com o objetivo de realizar ensaios de fosforilação *in vitro*, começámos por construir um plasmídeo com o gene *cotH* fundido ao *strep-tag* na extremidade 5' de modo à proteína CotH poder ser produzida em *E. coli* BL21(DE3) e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade. A estirpe de BL21(DE3) contendo o plasmídeo com o alelo *cotH*^{D228Q} fundido ao *strep-tag* já existia no *stock* do laboratório. O plasmídeo contendo o alelo selvagem foi construído do seguinte modo. A região codificante de *cotH*, fundida ao *strep-tag* na extremidade 5', foi obtida por amplificação por PCR com os *primers* cotHF e cotHR usando DNA cromossomal de *B. subtilis* (ver anexo 1, tabela 6.1). O produto de PCR foi inserido no plasmídeo pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, Inc), obtendo-se o vetor pCD9 (tabela 6.2). Este plasmídeo foi cortado com as enzimas de restrição NdeI e XhoI (Fermentas) e recuperado a partir do gel de eletroforese com recurso ao ZR Kit DNA Recovery Gel (Zymo Research), segundo as instruções do fabricante. Foi inserido entre os mesmos locais do plasmídeo pACYC-Duet (Novagen) e do plasmídeo pAP39 (que contém o gene *cotG* inserido no plasmídeo pACYC-Duet), originando pCD10 e pCD11, respetivamente (anexo 2). A estirpe AH4102 (anexo 1) foi obtida pela transformação de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo pCD10. Para superproduzir estas proteínas CotH-Strep-tag e CotG juntamente com CotB

transformou-se a estirpe AH4051 com o plasmídeo pCD10 e com o plasmídeo pCD11, originando as estirpes AH4104 e AH4105, respetivamente (anexo 1).

Como critério de funcionalidade da proteína de fusão CotH-Strep-tag foi usado a capacidade desta proteína de fosforilar CotB em *E. coli* com a consequente mudança de mobilidade de CotB em SDS-PAGE. Com esta finalidade as proteínas CotB-His₆, CotG, CotH, CotH^{wt}-Strep-tag, CotH^{D228Q}-Strep-tag em diferentes combinações foram superproduzidas em meio de Auto-Indução (anexo 4). Após lise mecânica das células, as proteínas, presentes no sedimento, foram analisadas por SDS-PAGE corado com azul de coomassie (figura 3.6).

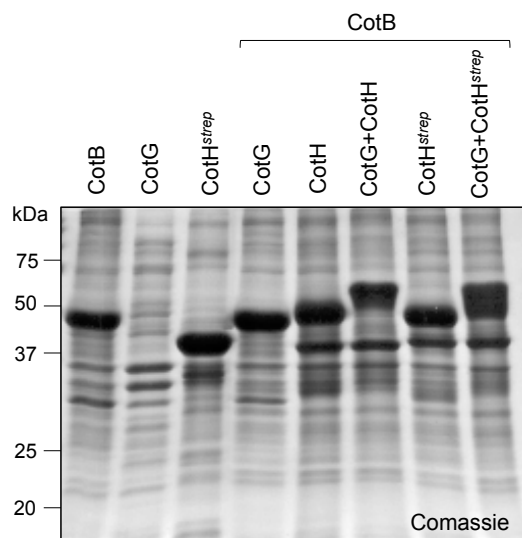


Figura 3.5 - CotH fundida com cauda de streptavidina no seu C-terminal mantém-se funcional. Foram utilizadas as estirpes AH4051 (CotB), AH4072 (CotG), AH4102 (CotH^{wt}-strep-tag), AH4071 (CotB+CotG), AH4079 (CotB+CotH), AH4080 (CotB+CotG+CotH), AH4104 (CotB+CotH^{wt}-strep-tag) e AH4105 (CotB+CotG+CotH^{wt}-strep-tag) (tabela 6.1). As proteínas foram superproduzidas por crescimento de 100ml das culturas das estirpes indicadas em meio de auto-indução. As células na suspensão foram lisadas mecanicamente e os extratos proteicos foram quantificados e as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE corado com azul de coomassie. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo do painel.

As amostras de CotB-His₆ e CotH-Strep-tag apresentam bandas com o tamanho esperado de cerca de 46 kDa e 42 kDa, respetivamente. CotG não é detetável por coloração com coomassie. Na amostra de CotB-His₆ com CotH-Strep-tag, como seria de esperar, denota-se um ligeiro arrastamento de CotB-His₆ para valores acima dos 46 kDa. A expressão de CotB-His₆ com CotG e CotH sem strep-tag em *E. coli* leva à produção de uma banda discreta da forma CotB-66 (resultados do laboratório; figura 3.5). Na figura 3.5, na amostra de indução de CotB com CotH-Strep-tag e CotG, a modificação pós-traducional é evidente, detetando-se o aumento de peso molecular de CotB-His₆. No entanto, a ausência de uma banda discreta de CotB-66, denota uma menor eficiência da cinase. Ainda assim, CotH-Strep-tag mantém-se parcialmente funcional sendo visível o efeito da sua atividade enzimática sobre CotB-His₆.

3.8. Super-produção e purificação de CotB-His₆, CotH^{WT}-Strep-tag e CotH^{D228Q}-Strep-tag

Após experiências *in vivo* e em *E. coli* quisemos demonstrar que juntar as proteínas CotB e CotH purificadas seria o suficiente para que ocorresse fosforilação de CotB. Ou seja, provar que CotH é uma cinase e CotB o seu substrato. Além disso, quisemos detetar a auto-fosforilação de CotH, já que a concentração da proteína *in vivo* não é suficiente para detetar nenhum sinal com o anticorpo que reconhece grupos fosforil (figura 3.1 C).

A purificação de CotB-46 foi realizada numa coluna de Ni²⁺-NTA e foram analisadas diversas amostras recolhidas ao longo do processo de purificação, por SDS-PAGE, como se pode observar na Figura 3.6, painel A. A proteína foi eluída na presença de 300mM de imidazol apresentando um bom grau de pureza e concentração (299 µg/mL).

Também foi necessário purificar CotH^{WT}-Strep-tag assim como a sua forma mutada para juntar a CotB purificado no ensaio de fosforilação *in vitro*. A purificação foi realizada numa coluna de *Strep-Tactin Sepharose* e foram analisadas diversas amostras recolhidas ao longo do processo de purificação, por SDS-PAGE, como se pode observar na Figura 3.6 B. As proteínas foram eluídas na presença de 2,5 mM de destibiotina, sendo que a segunda fração nos dois casos, apresentou um elevado grau de pureza e de concentração (88,2 µg/ml).

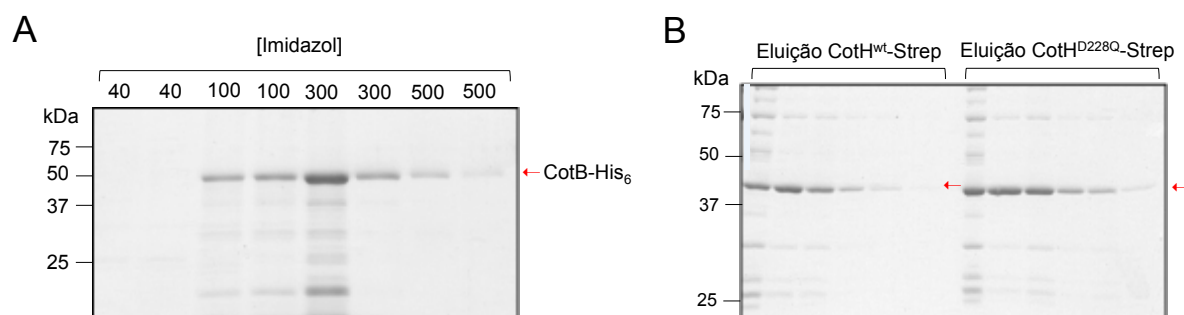


Figure 3.6 - Purificação da proteína CotB-His₆ e das proteínas CotH^{WT}-Strep e CotH^{D228Q}-Strep por cromatografia de afinidade. A e B) Análise da purificação da proteína CotB-His₆ (A) e das proteínas CotH^{WT}-Strep e CotH^{D228Q}-Strep (B) por eletroforese em géis de SDS-PAGE corados com azul de coomassie. As amostras do painel A representam as segundas e terceiras frações recolhidas das eluições com diferentes concentrações de imidazol (40, 100, 300 e 500 mM). As amostras do painel B representam as seis frações recolhidas de ambas as eluições com concentração de 2,5 mM de destibiotina das proteínas CotH^{WT} (frações à esquerda) e CotH^{D228Q} (frações à direita). A posição das proteínas CotB-His₆ e CotH^{WT}-Strep, CotH^{D228Q}-Strep está indicada por uma seta a vermelho do lado direito das respetivas amostras e a posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) representada do lado esquerdo dos painéis.

3.8.1 Auto-fosforilação de CotH dependente de concentração

As cinases sofrem auto-fosforilação (Pereira *et al.*, 2011). Desta forma podem transferir o grupo fosfato ao(s) seu(s) substrato(s) (Pereira *et al.*, 2011). Em extratos de *B. subtilis* a concentração de CotH não permitiu a detecção da sua fosforilação (figura 3.1 C). Resultados do laboratório mostram que, mesmo com superprodução de CotH em *E. coli*, a detecção de grupos fosfato por detecção imunológica apresenta um grau de resolução baixo. Neste estudo, para analisar a auto-fosforilação de CotH decidimos recorrer ao ensaio de fosforilação *in vitro* com ATP radioativo. Foram utilizadas as proteínas purificadas CotH^{wt}-Strep-tag ou CotH^{D228Q}-Strep-tag em duas concentrações diferentes, incubadas com tampão de fosforilação (anexo 6) num volume total de 20µl. A reação foi interrompida aos 30 min por adição de tampão de amostra e as proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE seguidas de coloração com coomassie (figura 3.7 A) ou revelação do sinal de radioatividade em chapa (figura 3.7 B).

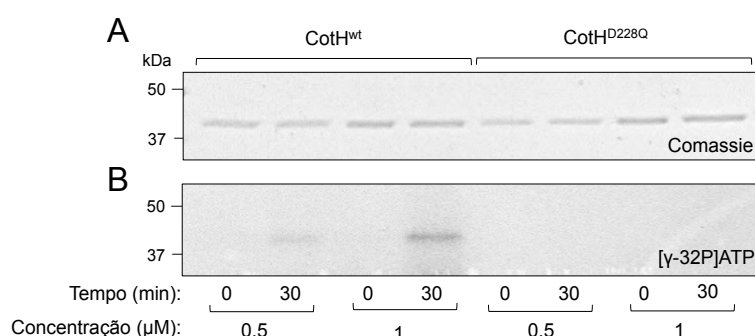


Figura 3.7 - Auto-fosforilação dependente de concentração As amostras com as cinases purificadas (0,5µM e 1 µM) foram incubadas com 0,1mM de ATP-frio, com e sem 1 µCi de [γ-32P]ATP em tampão de fosforilação (anexo 6) 0 min e 30 min a 30°C. As reações foram interrompidas por adição de tampão de amostra 10X (1:10), e resolvidas por SDS-PAGE. No caso das amostras que apenas continham ATP-frio, os géis foram corados com coomassie (painel A). Para revelação de radioatividade os géis foram secos, seguidos de exposição a um filme de autoradiografia, durante a noite a -80°C (painel B). As chapas foram reveladas em solução de revelação e de fixação. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis.

No painel A, é visível o aumento de intensidade de coloração nas amostras de CotH^{wt}-Strep-tag e CotH^{D228Q}-Strep-tag com 1 µM comparativamente com 0,5µM. Como esperado, o sinal de radioatividade de γ³²P está ausente nas amostras de CotH mutado no resíduo D228. Em CotH^{wt}, aos 30 min, o sinal de maior intensidade está em concordância com o aumento de concentração da cinase.

Estes resultados mostram que CotH é capaz de auto-fosforilação, demonstrando a sua atividade de cinase. Tal como esperado o resíduo D228 é essencial para esta atividade.

3.8.2 Atividade de CotH insensível a staurosporina

Staurosporina é um inibidor de cinases de Ser/Thr (Meggio *et al.*, 1995, Ward & O'Brian, 1992, Tamaoki *et al.*, 1986). O intervalo de valores de inibição da staurosporina à maioria das cinases de Ser/Thr é entre 6 e 50 nM (Meggio, Flavio, 1995). Duas exceções consideráveis são as cinases CaM-kinaseIII e CK1 cujos valores estão três a quatro ordens de grandeza acima (100µM e 365µM, respetivamente).

Quisemos testar a inibição da auto-fosforilação de CotH, utilizando este inibidor, através da técnica de fosforilação *in vitro*. Foram utilizadas as proteínas CotH^{wt}-Strep-tag e CotH^{D228Q}-Strep-tag, incubadas com tampão de fosforilação com e sem [γ-32P]ATP. A reação foi interrompida aos 30 min por adição de tampão de amostra e as proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE seguidas de coloração com coomassie (figura 3.8 A) ou revelação do sinal de radioatividade em chapa (figura 3.8 B).

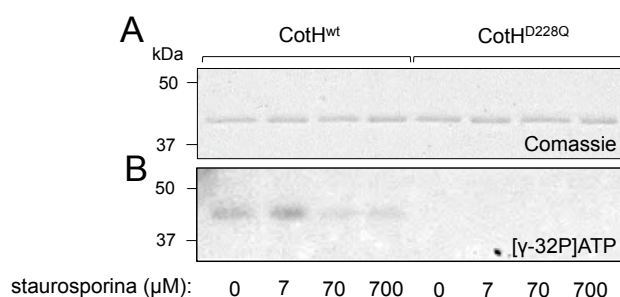


Figura 3.8 - Insensibilidade de CotH a staurosporina. Neste ensaio de inibição foram utilizadas as duas proteínas purificadas CotH^{wt}-Strep-tag e CotH^{D228Q}-Strep-tag e staurosporina como inibidor. As cinases (0,5µM) foram incubadas com 0,1mM de ATP-frio, com e sem 1 µCi de [γ-32P]ATP em tampão de fosforilação durante 30 min a 30°C. Antes da adição de ATP foram adicionadas às amostras diferentes concentrações de staurosporina. As reações foram interrompidas por adição de tampão de amostra 10X (1:10), e resolvidas por SDS-PAGE. Os géis foram corados com coomassie (painel A) (e neste caso as amostras só continham ATP-frio) ou foram secos, seguidos de exposição a um filme de autoradiografia, durante a noite a -80°C (painel B). As chapas foram reveladas em solução de revelação e de fixação. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis.

Em testes iniciais usámos concentrações de staurosporina entre os 20 e 4000 nM e não foi detetada qualquer inibição (resultados não apresentados). De seguida, usámos concentrações maiores de staurosporina, na ordem dos micromolares, de modo a confirmar a insensibilidade de CotH ao inibidor. Na figura 3.8 A, a coloração com coomassie confirma a presença das proteínas, em cada reação, numa concentração constante (de 0,5 µM). Na análise do painel B, pode ver-se que só para as concentrações de 70 µM e 700 µM é que a staurosporina parece ter um efeito sobre a atividade de CotH. Ainda assim é detetado algum sinal, comparativamente às amostras controlo-negativo, com CotH mutado, em que não há qualquer sinal de radioatividade.

Esta insensibilidade à staurosporina pode dever-se à estrutura de CotH, homóloga das cinases Ser/Thr HipA e CtkA (Xiao *et al.*, 2013), também elas insensíveis à ação da staurosporina. Demonstramos assim que CotH é uma das exceção às cinases Ser/Thr sensíveis à staurosporina.

3.8.3 CotH fosforila CotB-46 purificado *in vitro*

Na sua totalidade, os resultados descritos neste estudo sugerem uma ação enzimática da proteína CotH de *B. subtilis* que origina a sua auto-fosforilação e a formação de CotB-66. Os estudos aqui realizados mostraram que a cinase CotH é responsável pela fosforilação de CotB em *E. coli* e *in vivo*. Contudo, *in vitro*, essa propriedade ainda não foi demonstrada. Para verificarmos se CotH é necessário e suficiente para a modificação de CotB-46 recorremos ao método de fosforilação *in vitro* com [γ -³²P]ATP, utilizando para isso as duas formas purificadas da proteína CotH assim como CotB-46 purificado. As cinases (0,5 μ M) e o substrato (2 μ M) foram incubadas com 0,1mM de ATP-frio, com e sem [γ -³²P]ATP em tampão de fosforilação durante 5, 10 e 30 min a 30°C. A reação foi interrompida por adição de tampão de amostra e as proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE seguidas de coloração com coomassie (figura 3.9 A) ou revelação do sinal de radioatividade em chapa (figura 3.9 B).

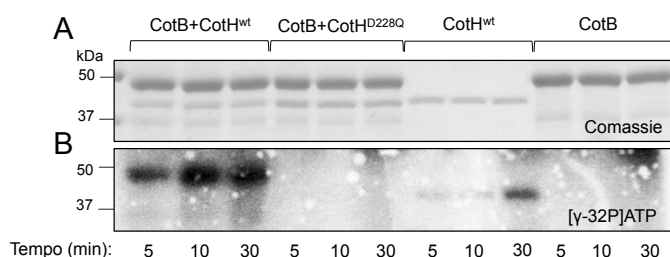


Figura 3.9 - Fosforilação de CotB-46 e auto-fosforilação de CotH *in vitro*. Foram utilizadas as proteínas purificadas CotH^{wt}-Strep-tag, CotH^{D228Q}-Strep-tag e CotB-His₆. As cinases (0,5 μ M) e o substrato (2 μ M) foram incubadas com 0,1mM de ATP-frio, com e sem 1 μ Ci de [γ -³²P]ATP em tampão de fosforilação durante 5, 10 e 30 min a 30°C. As reações foram interrompidas por adição de tampão de amostra 10X (1:10), e resolvidas por SDS-PAGE. Os géis ou foram corados com coomassie (painel A) (e neste caso as amostras só continham ATP-frio) ou foram secos, seguidos de exposição a um filme de autoradiografia, durante a noite a -80°C (painel B). As chapas foram reveladas em solução de revelação e de fixação. A posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) está representada do lado esquerdo dos painéis.

Na análise da coloração com coomassie podemos verificar que cada proteína se encontra a igual concentração em cada reação. Como esperado deteta-se CotB-46, CotH^{wt} e CotH^{D228Q}.

A análise do painel B demonstra que o CotB foi marcado com [γ -³²P]ATP nas amostras com CotH^{wt}. A fosforilação ocorreu logo aos 5 min aumentando de intensidade até ao final na reação. Como esperado, nas amostras controlo de CotB sozinho ou com CotH^{D228Q}, não se deteta qualquer

fosforilação. A auto-fosforilação de CotH é também detetada na figura 3.9 B, com maior intensidade ao fim dos 30 min de reação.

Concluimos que, também *in vitro*, CotB-46 é um substrato da cinase CotH.

Discussão

O manto é organizado pela ação concertada de proteínas morfogenéticas essenciais para a montagem das proteínas estruturais desta camada protetora do esporo (Henriques e Moran, 2007). Neste trabalho centrámos o nosso estudo na caracterização de uma dessas proteínas estruturais: CotB.

CotB é sintetizado como uma espécie de 46 kDa durante a esporulação (após 6 horas do início da esporulação – T6) e é convertido numa forma de 66 kDa. A eliminação quer de *cotG* quer de *cotH* em *B. subtilis* impede a formação de CotB-66. A necessidade de CotH para formação de CotB-66 poderá em parte resultar do seu papel na estabilização de CotG (Zilhão *et al.*, 2004). A super-produção de CotB sozinho em *E. coli* ou a expressão antecipada (à hora 4 da esporulação) deste gene em *B. subtilis*, leva à produção de CotB na sua forma não modificada de 46 kDa (Zilhão *et al.*, 2004). Em estudos anteriores verificou-se que *in vivo* CotG interage fortemente com a proteína CotB inteira (Zilhão *et al.*, 2004).

Resultados ainda não publicados deste Laboratório confirmam que CotG e CotH são componentes importantes na alteração de mobilidade eletroforética de CotB. Quando os três genes são expressos em *E. coli* ocorre a formação de CotB-66 mas quando CotG ou CotH são expressos individualmente com CotB, tal já não se verifica. Uma busca para homólogos estruturais utilizando o servidor Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009), mostrou a presença no N-terminal de CotB de dois motivos *Sm-like*. Estes domínios têm normalmente uma função na interação RNA-RNA e RNA-proteína. Por sua vez, CotH possui uma estrutura homóloga com cinases de Ser/Thr assim como um centro ativo conservado.

Como referido anteriormente, a expressão de CotB-66 é dependente de *cotG* e de *cotH* (Zilhão, R. *et al* 2004). Estudos realizados deixaram em aberto a questão de que maneira CotG ou CotH são responsáveis pela modificação pós-traducional da proteína mais abundante à superfície do esporo. Tendo em conta a descoberta da homologia estrutural de CotH com cinases de Ser/Thr (Figura 1.5 A e B) esta proteína foi considerada como um potencial alvo direto para modificar CotB-46, por fosforilação. Neste trabalho, explorámos em primeiro lugar a atividade de CotH para, de seguida, testarmos o seu modo de atuação sobre CotB.

A primeira abordagem esteve relacionada com o centro ativo de CotH. Construímos duas estirpes, uma com a região promotora e codificante do gene selvagem *cotH* no locus *amyE*, como controlo, e uma com construção semelhante, sendo que na região codificante do gene foi inserida a mutação simples D228Q (figura 3.2 A). Em concordância com os efeitos anteriormente observados em esporos *cotH* (Naclerio *et al.*, 1996), a produção do alelo de *cotH* mutado no resíduo D228 demonstrou ser responsável por alterações na composição proteica (figuras 3.2 B e 3.3 A) assim como em propriedades fisiológicas (figura 3.3 B) da camada superficial do esporo de *B. subtilis*.

Tendo em consideração a necessidade de *cotG* e *cotH* para formar CotB-66 em *E. coli* (resultados do laboratório, figura 3.5) bem como a descoberta da homologia de CotH com cinases de Ser/Thr (figura 1.5), fomos testar a hipótese da modificação pós-traducional de CotB, anteriormente descrita,

ser executada por CotH *in vivo*. Para tal procedemos à desfosforilação das proteínas do manto do esporo da estirpe selvagem e de complementação por ação da fosfatase alcalina. Relativamente à amostra da estirpe $\Delta cotH/cotH^{wt}$ desfosforilada, o anticorpo anti-CotB não deveria ter reconhecido nenhuma banda com tamanho superior a 46 kDa assim como o anticorpo anti-Pser não deveria ter revelado qualquer sinal (tal como se verificou no caso da estirpe selvagem desfosforilada) (figura 3.1 B e C). Também no caso do anticorpo CotG deteta-se uma banda de sinal forte na estirpe de complementação sujeita a desfosforilação, ao contrário da estirpe selvagem desfosforilada onde não há deteção de qualquer sinal (figura 3.1 D). Tais resultados, levam-nos a supor que a ação exercida por parte da fosfatase alcalina não foi total e que a ineficácia da sua ação desfosforilativa se deveu à concentração superior de cinase CotH da estirpe de complementação. Ainda assim, notamos que a ação da enzima terá sido suficiente para a desfosforilação de CotB na estirpe selvagem, já que nos extratos desfosforilados desta estirpe, CotB é reconhecido com uma banda de 46 kDa com anti-CotB e deixa de ser reconhecido por anticorpos específicos para o grupo fosfato (figura 3.1 B e C).

A análise de MET apoia a função morfogenética característica da proteína CotH, uma vez que esporos sem produção de CotH ou com produção de CotH inativo apresentaram alterações visíveis na organização das proteínas do manto (figura 3.4 C e D) (Zilhao *et al.*, 1999)

Os resultados de análise bioquímica e biológica realizada a $\Delta cotH$ e $\Delta cotH/cotHD228Q$ apoiam a conclusão de que o resíduo 228 do centro ativo de CotH é importante para a atividade enzimática de CotH, segue-se que a mutação pontual de *cotH D228Q*, corresponde a uma mutação de perda de função.

Por sua vez, CotB também revelou ter um papel relevante na morfologia dos esporos, uma vez que, a sua eliminação levou a alterações visíveis na estrutura e dimensão do manto externo (figura 3.4 E). A influência desta proteína para a arquitetura do esporo de *B. subtilis* já tinha sido descrita em análises de Microscopia de Força Atómica onde um mutante *cotB* apresentou um padrão alterado na nervura da superfície do esporo comparativamente à superfície de um esporo selvagem (Chada *et al.*, 2003). Colocamos a hipótese da importância de CotB para a morfogénese do esporo se dever à presença do enorme número de fosfatos, que conferem uma elevada carga negativa à proteína, permitindo deste modo a interação com iões metálicos, presentes no esporo. Esta interação levaria à formação da estrutura eletrodensa, tipicamente presente no manto de *B. subtilis* e passível de observar por MET.

É ainda de realçar que no mutante *cotB* verificou-se a separação dos mantos externo e interno (figura 3.4 E) dando origem a uma região de aspeto semelhante ao inter-espaco - camada situada entre o manto e o exósporo. O exósporo é a camada mais externa do esporo de alguns *Bacillus*, como por exemplo, *B. anthracis* e *B. cereus*, sendo constituída por glicoproteínas e importante na proteção do esporo e interações com o exterior (figura 4.1 A ;Henriques & Moran, 2007).

B. subtilis possui proteínas do manto homólogas a proteínas do exósporo de *B. anthracis* (Henriques & Moran, 2007). A presença destas proteínas em ambas as estruturas (manto e exósporo) sugere uma semelhança estrutural e funcional destas duas camadas (Steichen *et al.*, 2005). No entanto,

a estrutura correspondente ao exósporo, ou seja, a camada mais superficial do esporo, em *B. subtilis*, é a crosta. Esta camada externa foi descoberta recentemente por MET após coloração das amostras com vermelho de rutênio (figura 1.2 A). Este corante não é muito específico uma vez que cora açúcares, aminoácidos livres e algumas proteínas e lípidos (McKenney *et al.*, 2012). Como tal, a constituição da crosta ainda não foi determinada.

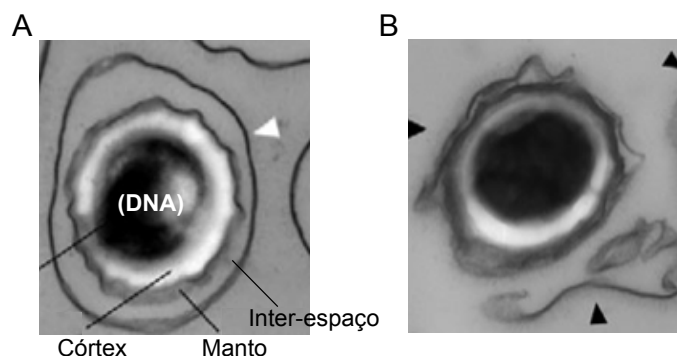


Figura 4.1 - Estrutura macromolecular do esporo de *B. anthracis*. A figura mostra imagens de MET de cortes transversais de esporos de estirpe selvagem (A) e mutante nulo *exsB* (B) de *B. anthracis* (Retirado de McPherson *et al.*, 2010). A microscopia eletrônica do esporo *exsB* foi preparada em meio sólido e mostra um esporo raro, em que foi possível visualizar a perda de ligação de partes do exósporo. A seta branca aponta para um exósporo intacto e as setas pretas apontam para fragmentos do exósporo. O córtex, o manto (externo e interno) assim como o compartimento central com o DNA estão visíveis em A. Além destas estruturas é visível o exósporo separado do manto eletrodense por uma região denominada de inter-espaco.

ExsB é uma proteína do exósporo de *B. anthracis* e sofre fosforilação em pelo menos 14 dos seus 19 resíduos de treonina (McPherson *et al.*, 2010). A eliminação desta proteína num esporo de *B. anthracis* leva à destabilização da ligação do exósporo com as restantes camadas do esporo. Em esporos tratados em meio líquido a destabilização é evidenciada pela perda do exósporo em 100% dos casos; em esporos tratados em meio sólido apenas 2% sofre perdas do exósporo (Figura 4.1 B) (McPherson *et al.*, 2010). Sugerimos, então, que CotB possa ter um papel importante na estabilização e formação do manto externo ou da crosta de *B. subtilis*, já que também é uma proteína altamente fosforilada. Para além disso, seria interessante verificar se a presença de CotB em *B. anthracis* levaria a um espessamento do manto externo (que é mais fino que o de *B. subtilis*) e eventualmente a uma diminuição do inter-espaco, camada não existente em *B. subtilis* (figura 4.1 A).

As cinases sofrem auto-fosforilação, transferindo numa segunda etapa, o grupo fosfato ao(s) seu(s) substrato(s) (Pereira *et al.*, 2011). Nas experiências *in vitro* com as duas proteínas CotH^{wt}strep-tag e CotH^{D228Q}strep-tag purificadas conseguimos detetar a auto-fosforilação de CotH e demonstrar que os seus níveis são dependentes da concentração de cinase presente no ensaio (figura 3.7 A e B).

Neste estudo reportamos ainda a insensibilidade de CotH perante valores com 3 a 4 ordens de grandeza acima do intervalo de ação comumente observado para o inibidor staurosporina (figura 3.8 A e B). As proteínas CtkA e HipA, homólogas de CotH, são duas cinases de Ser/Thr denominadas

“incomuns” (*atypical* em Inglês) devido à sua estrutura (Schumacher *et al.*, 2012, Tagliabracci *et al.*, 2012). ceFam20 é uma cinase eucariota também denominada “incomum” devido a fatores como: ser ativada por Mn^{2+} em alternativa ao Mg^{2+} ; só aceitar ATP e não GTP como doador de fosfato; ser insensível ao inibidor de largo espectro, staurosporina (o seu efeito só é registado a partir de 200 μ M) (Tagliabracci *et al.*, 2012). A sequência de ceFam20 é semelhante à sequência de cinases procariotas como CtkA e HipA (Xiao *et al.*, 2013). Uma análise aprofundada desta proteína apontou a sua estrutura como razão molecular para a sua insensibilidade anormal, nomeadamente devido ao tamanho demasiado longo do loop β 1- β 2 rico-em-glicina (presente nas cinases de Ser/Thr) e devido à presença, nesta região, de determinados resíduos como o de lisina (na posição 178 de ceFam20), que possivelmente interferem com as regiões aromáticas de staurosporina, impedindo-a de competir com o ATP (Xiao *et al.*, 2013). A lisina referida não está presente nas cinases comuns, mas encontra-se nas proteínas HipA e CtkA (resíduo na posição 24 - figura 1.5 A) (Xiao *et al.* 2013; Tagliabracci *et al.*, 2012).

Analisando o alinhamento de CotH com CtkA verificamos que nessa região CotH possui três resíduos de lisina antes da folha β 1 e uma lisina entre β 1 e β 2 (figura 1.5 A, nas posições 58,59,60 e 70). Inferimos assim que uma dessas lisinas deverá corresponder ao resíduo K24 de CtkA (figura 1.5 A), sendo um dos fatores responsáveis pela insensibilidade de CotH à staurosporina.

O último estudo aqui realizado mostrou que a cinase CotH é responsável não só pela fosforilação de CotB em *E. coli* e *in vivo* como também *in vitro* (figura 3.9 A e B). O facto de na presença de CotH o sinal radioativo de CotB não ter chegado aos 66 kDa deve-se à falta de CotG assim como à menor eficiência de CotH com cauda de streptavidina na sua metade C terminal (figura 3.9 B). Ainda assim demonstrámos que CotH consegue alterar a forma imatura de CotB por interação direta com esta proteína. Todavia, esta interação não é necessariamente uma interação forte, tendo em conta os resultados, *in vitro*, num sistema de dois híbridos em levedura onde não foi detetada nenhuma interação de CotH com CotB ou com CotG (Zilhao *et al.*, 2004). Nos ensaios *in vitro* realizados nesta investigação, a fonte de grupos fosfato utilizada foi o ATP. Questionamo-nos qual será a fonte de fosfato *in vivo* para a fosforilação por parte de CotH já que o ATP nos parece ser um componente bastante dispendioso do ponto de vista energético para a célula. No entanto, se eventualmente se vier a verificar que o ATP é a fonte utilizada por CotH isso pode ajudar a explicar o facto de no interior do esporo não haver ATP disponível e haver níveis reduzidos de AMP. Nas primeiras etapas de germinação dos esporos, a maioria da energia necessária é obtida através do metabolismo de depósitos significativos de 3-fosfoglicerato que leva à síntese do ATP e através da utilização de alguns aminoácidos – obtidos por proteólise das chamadas proteínas pequenas e solúveis em meio ácido (SASP em Inglês) (Jedrzej, 2002).

Durante a execução experimental desta tese, tivemos acesso a resultados de um ensaio de espectrometria de massa onde se verifica que CotB e CotG sofrem efetivamente fosforilação nos seus resíduos de serina, 22 e 6 resíduos, respetivamente. Os resíduos de serina de CotB encontram-se na

metade C-terminal do gene numa sequência de quatro regiões repetidas SKR - ricas em serinas, lisinas e argininas (figura 1.4 A). A proteína CotG possui as suas serinas fosforiladas numa sequência de cinco regiões repetidas (figura 1.4 B). Com estes dados, a proteína CotB de *B. subtilis* revelou-se a proteína mais extensivamente fosforilada de todas as fosfo-proteínas bacterianas já caracterizadas (McPherson *et al.*, 2010). Como já referido, a modificação pós-traducional da proteína CotB *in vivo* reduz fortemente a sua mobilidade eletroforética (figura 3.1 A e B Zilhão *et al.*, 2004). Tendo em consideração que a adição de 22 grupos fosfatos (cada um com aproximadamente 0,095 kDa - informação retirada de PubChem) apenas contribui para um aumento de cerca de 2 kDa no peso total da proteína, outra questão que nos colocámos foi que mecanismo seria o responsável por esta diferença de peso não espectável. A técnica de SDS-PAGE consiste em desnaturar as proteínas e conferir-lhes carga negativa, para que migrem em direção ao polo positivo do gel, consoante uma só variável - o seu peso molecular (Gallagher, 2007). Já foram reportados casos em que proteínas fosforiladas não se comportam segundo o seu tamanho. Julgamos que, no caso de CotB, a resposta pode estar no papel protetor da fosforilação, função que já foi referida acima. Consideramos que nesta proteína o número de resíduos modificados será suficientemente elevado para que a fosforilação impeça a desnaturação por ação do SDS (se não na totalidade, pelo menos em parte) de CotB. Assim a sua estrutura não linear interferirá com a migração no gel, retardando a mobilidade eletroforética desta cadeia polipeptídica em cerca de 18 kDa.

Tanto nos procariotas como nos eucariotas, a fosforilação é uma modificação normalmente utilizada em processos reversíveis onde mecanismos de regulação celular são ativados ou interrompidos por adição (por cinases) ou recolha (por fosfatases) de grupo(s) fosfato ao(s) substrato(s) proteico(s) em causa (Pereira *et al.*, 2011). Nos procariotas são exemplos destes processos a divisão celular, a regulação da síntese proteica, a persistência e a multi-resistência a antibióticos (Beilharz *et al.*, 2012, Jin *et al.*, 2010, Schumacher *et al.*, 2012, Kaspy *et al.*, 2013). No caso da montagem do manto do esporo, julgamos que a fosforilação das proteínas que o vão constituir deverá ser um processo não-reversível tendo em conta que a estrutura depois de formada não sofrerá muitas alterações, de modo a ser resistente e conseguir proteger o esporo, se necessário, durante milhões de anos (Henriques & Moran, 2007). Tendo em conta o caso da proteína ExsB, cuja a elevada fosforilação é importante para a estrutura do exósporo de *B. anthracis* (McPherson *et al.*, 2010) consideramos que também a fosforilação da proteína CotB poderá ter um papel estrutural para o manto de *B. subtilis*. Assim sendo, para perceber a relevância da fosforilação de CotB vão ser necessários mais estudos, nomeadamente sobre o envolvimento da região SKR (C-terminal de CotB rico em serinas, lisinas e argininas) em propriedades de resistência ao calor e a enzimas líticas, assim como na interação de CotB com ele próprio e com CotG ou ainda na formação do manto externo ou da crosta em redor do pré-esporo. Contudo, a modificação de CotB parece ter um papel na localização da proteína já que em mutantes *cotG*, a proteína CotB fundida a GFP localiza em anel em vez de localizar a meio da células como acontece na estirpe selvagem (Imamura *et al.*, 2010). No entanto, estes dados

têm de ser confirmados já que há uma publicação em contrário, onde está descrita a localização de CotB em forma de anel na estirpe selvagem, e a não dependência de *cotG* nem de *cotH* nessa localização (Kim *et al.*, 2006).

A interação verificada de CotB com ele próprio (Zilhão *et al.*, 2004) suporta a hipótese de ocorrer multimerização ou, pelo menos, dimerização da proteína CotB. Esta propriedade é característica das proteínas *Sm-like* (Wilusz & Wilusz, 2005). Pode investigar-se esta questão, recorrendo a espectrometria de massa, para verificar se o peso do CotB surge em valor múltiplo ao normal ou não. Uma vez que o domínio *Sm* está relacionado com interação RNA-proteína (Wilusz & Wilusz, 2005), de futuro será testada a interação de CotB com ácidos nucleicos e em última análise testar se CotB estaria envolvido no controlo de transcrição localizada. Seria revolucionário se se verificasse que durante a morfogénese do manto determinadas proteínas que o compõem são produzidas no local de montagem macromolecular com a ajuda de proteínas como CotB, em vez de serem produzidas no citoplasma, e recrutadas depois para este local, numa segunda etapa.

Por fim apresentamos um modelo, representado na Figura 4.2, com as interações de CotH com CotB e CotG. Sendo uma cinase do manto, fosforila decerto diversos substratos *in vivo* para além destas duas proteínas. Neste trabalho provámos que quer *in vitro* quer *in vivo* CotB é fosforilado por CotH, sendo que a fosforilação de CotB é mais eficiente na presença de CotG, que parece funcionar como um co-fator. Tendo em conta a interação verificada entre CotB e CotG tanto *in vitro* como *in vivo* (Zilhão *et al.*, 2004), sugerimos que estas formem um complexo que, de algum modo, facilita o acesso da cinase ao domínio C-terminal de CotB.

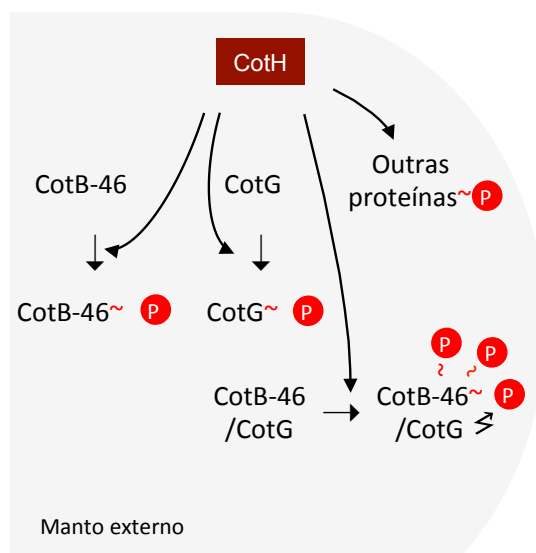


Figura 4.2 - Modelo para a interação de CotH, CotB e CotG. O modelo representa o modo de ação da proteína CotH sobre outras proteínas. CotH fosforila CotG, CotB e outras proteínas do manto. A fosforilação de CotB torna-se máxima na presença de CotH e CotG. CotB e CotG formam um complexo. Supõe-se que CotG interaja com CotB de modo a expor a sua região SKR à cinase CotH.

Sendo CotB uma proteína abundante do manto externo que se localiza à superfície do esporo, tem sido utilizada como um veículo para a colocação de antígenos heterólogos à superfície do esporo (Duc le *et al.*, 2003). Uma caracterização mais aprofundada desta proteína e do seu processo de montagem no manto irá permitir uma melhor manipulação, para uso biotecnológico e biomédico, do esporo de *B. subtilis*.

5. Bibliografia

- Beilharz, K., L. Novakova, D. Fadda, P. Branny, O. Massidda & J. W. Veening, (2012) Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E905-913.
- Chada, V. G., E. A. Sanstad, R. Wang & A. Driks, (2003) Morphogenesis of bacillus spore surfaces. *J Bacteriol* **185**: 6255-6261.
- Correia, F. F., A. D'Onofrio, T. Rejtar, L. Li, B. L. Karger, K. Makarova, E. V. Koonin & K. Lewis, (2006) Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 8360-8367.
- Duc le, H., H. A. Hong, N. Fairweather, E. Ricca & S. M. Cutting, (2003) Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun* **71**: 2810-2818.
- Gallagher, S. R., (2007) One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 6**: Unit 6 1.
- Galperin, M. Y., S. L. Mekhedov, P. Puigbo, S. Smirnov, Y. I. Wolf & D. J. Rigden, (2012) Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environ Microbiol* **14**: 2870-2890.
- Giglio, R., R. Fani, R. Istatico, M. De Felice, E. Ricca & L. Baccigalupi, (2011) Organization and evolution of the cotG and cotH genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 6664-6673.
- Harwood, C. R. & I. Moszer, (2002) From gene regulation to gene function: regulatory networks in *Bacillus subtilis*. *Comp Funct Genomics* **3**: 37-41.
- Henriques, A. O. & C. P. Moran, Jr., (2007) Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* **61**: 555-588.
- Hilbert, D. W. & P. J. Piggot, (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 234-262.
- Hong, H. A., J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci & S. M. Cutting, (2008) The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol* **105**: 510-520.
- Imamura, D., R. Kuwana, H. Takamatsu & K. Watabe, (2010) Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol* **192**: 518-524.
- Istatico, R., G. Cangiano, H. T. Tran, A. Ciabattini, D. Medagliani, M. R. Oggioni, M. De Felice, G. Pozzi & E. Ricca, (2001) Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **183**: 6294-6301.
- Jedrzejewski, M. J., (2002) Three-dimensional structure and molecular mechanism of novel enzymes of spore-forming bacteria. *Med Sci Monit* **8**: RA183-190.
- Jin, Y. Y., J. Cheng, S. H. Yang, L. Meng, S. A. Palaniyandi, X. Q. Zhao & J. W. Suh, (2010) S-adenosyl-L-methionine activates actinorhodin biosynthesis by increasing autophosphorylation of the Ser/Thr protein kinase AfsK in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 910-913.
- Kaspy, I., E. Rotem, N. Weiss, I. Ronin, N. Q. Balaban & G. Glaser, (2013) HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* **4**: 3001.
- Kelley, L. A. & M. J. Sternberg, (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363-371.
- Kim do, J., K. S. Park, J. H. Kim, S. H. Yang, J. Y. Yoon, B. G. Han, H. S. Kim, S. J. Lee, J. Y. Jang, K. H. Kim, M. J. Kim, J. S. Song, H. J. Kim, C. M. Park, S. K. Lee, B. I. Lee & S. W. Suh, (2010) *Helicobacter pylori* proinflammatory protein up-regulates NF-kappaB as a cell-translocating Ser/Thr kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21418-21423.
- Kim, H., M. Hahn, P. Grabowski, D. C. McPherson, M. M. Otte, R. Wang, C. C. Ferguson, P. Eichenberger & A. Driks, (2006) The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol Microbiol* **59**: 487-502.
- Kim, J. & W. Schumann, (2009) Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3127-3136.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J.

- Cordani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denziot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mael, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, et al., (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lightfoot, Y. L., T. Yang, B. Sahay, M. Zadeh, S. X. Cheng, G. P. Wang, J. L. Owen & M. Mohamadzadeh, (2014) Colonic Immune Suppression, Barrier Dysfunction, and Dysbiosis by Gastrointestinal *Bacillus anthracis* Infection. *PLoS One* **9**: e100532.
- McKenney, P. T., A. Driks & P. Eichenberger, (2012) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**: 33-44.
- McPherson, S. A., M. Li, J. F. Kearney & C. L. Turnbough, Jr., (2010) ExsB, an unusually highly phosphorylated protein required for the stable attachment of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **76**: 1527-1538.
- Meggio, F., A. Donella Deana, M. Ruzzene, A. M. Brunati, L. Cesaro, B. Guerra, T. Meyer, H. Mett, D. Fabbro, P. Furet & et al., (1995) Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur J Biochem* **234**: 317-322.
- Naclerio, G., L. Baccigalupi, R. Zilhao, M. De Felice & E. Ricca, (1996) *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires cotH gene expression. *J Bacteriol* **178**: 4375-4380.
- Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh & P. Setlow, (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 548-572.
- Pereira, S. F., L. Goss & J. Dworkin, (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 192-212.
- Potot, S., C. R. Serra, A. O. Henriques & G. Schyns, (2010) Display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores, using a coat-associated enzyme as the carrier. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5926-5933.
- Rineh, A., M. J. Kelso, F. Vatansever, G. P. Tegos & M. R. Hamblin, (2014) *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Rev Anti Infect Ther* **12**: 131-150.
- Sacco, M., E. Ricca, R. Losick & S. Cutting, (1995) An additional GerE-controlled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 372-377.
- Saggese, A., V. Scamardella, T. Sirec, G. Cangiano, R. Isticato, F. Pane, A. Amoresano, E. Ricca & L. Baccigalupi, (2014) Antagonistic Role of CotG and CotH on Spore Germination and Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **9**: e104900.
- Sambrook, J., Russel, D., (2001) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schumacher, M. A., J. Min, T. M. Link, Z. Guan, W. Xu, Y. H. Ahn, E. J. Soderblom, J. M. Kurie, A. Evdokimov, M. A. Moseley, K. Lewis & R. G. Brennan, (2012) Role of unusual P loop ejection and autophosphorylation in HipA-mediated persistence and multidrug tolerance. *Cell Rep* **2**: 518-525.
- Schwarz, W. H., (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 634-649.
- Tagliabracchi, V. S., J. L. Engel, J. Wen, S. E. Wiley, C. A. Worby, L. N. Kinch, J. Xiao, N. V. Grishin & J. E. Dixon, (2012) Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* **336**: 1150-1153.

- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto & F. Tomita, (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **135**: 397-402.
- Ward, N. E. & C. A. O'Brian, (1992) Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. *Mol Pharmacol* **41**: 387-392.
- Wilusz, C. J. & J. Wilusz, (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 1031-1036.
- Xiao, J., V. S. Tagliabracci, J. Wen, S. A. Kim & J. E. Dixon, (2013) Crystal structure of the Golgi casein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 10574-10579.
- Zilhao, R., G. Naclerio, A. O. Henriques, L. Baccigalupi, C. P. Moran, Jr. & E. Ricca, (1999) Assembly requirements and role of CotH during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 2631-2633.
- Zilhao, R., M. Serrano, R. Isticato, E. Ricca, C. P. Moran, Jr. & A. O. Henriques, (2004) Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* **186**: 1110-1119.

6. Anexos

6.1 Anexo 1 – Estirpes utilizadas neste estudo

Tabela 6.1 - Estirpes utilizadas neste estudo

Estirpes	Genótipo / características relevantes*	Marca de seleção**	Origem ou referência
<i>E. coli</i>			
AH4051	BL21(DE3) / pMS16 (CotB::His ₆)	Kan	Coleção do laboratório
AH4071	AH4051 / pAP39 (CotG)	Kan Cm	“
AH4072	BL21(DE3) / pAP39 (CotG)	Cm	“
AH4079	AH4051 / pNP3 (CotH)	Kan Cm	“
AH4080	AH4051 / pNP4 (CotG e CotH)	Kan Cm	“
AH4085	BL21(DE3) / pNP5 (CotH ^{D228Q} -strep-tag)	Cm	“
AH4102	BL21 (DE3) / pCD10 (CotH ^{WT} -strep-tag)	Cm	Este trabalho
AH4104	AH4051 / pCD10 (CotH ^{WT} -strep-tag)	Kan Cm	“
AH4105	AH4051 / pCD11 (CotG+CotH ^{WT} -strep-tag)	Kan Cm	“
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>		Novagen
DH5α	<i>dlacZ Δ M15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>		GIBCO/BRL
<i>B. subtilis</i>			
MB24	<i>trpC2 metC3</i>		Coleção do laboratório
AH4094	<i>trpC2 metC3 ΔcotH::cm</i>	Cm	“
AH4095	<i>trpC2 metC3 ΔcotB::cm</i>	Cm	“
AH4097	<i>trpC2 metC3 ΔcotH::cm ΔamyE::cotH^{wt}</i>	Cm Neo	Este trabalho
AH4098	<i>trpC2 metC3 ΔcotH::cm ΔamyE::cotH^{D228Q}</i>	Cm Neo	“
AH4106	<i>trpC2 metC3 ΔcotG::cm</i>	Cm	Coleção do laboratório

6.2 Anexo 2 – Plasmídeos utilizados neste estudo

Tabela 6.2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho

Estirpes	Características relevantes	Marca de seleção
pACYCDuet-1	Vetor de clonagem	Cm
pET-30a	Vetor de clonagem	Kan
pJET1.2	Vetor de clonagem	Amp
pMS16	<i>cotB</i> -His ₆ em pET-30a	Kan
pAP39	<i>cotG</i> em pACYCDuet-1	Cm
pNP3	<i>cotH</i> em pACYCDuet-1	Cm
pNP4	<i>cotH</i> em pAP39	Cm
pNP5	<i>cotH</i> D228Q* em pACYCDuet-1	Cm
pCD6	pMLK83 sem gene <i>gus</i>	Amp
pCD7	<i>cotH</i> ^{wt} em pCD6	Cm Neo
pCD8	<i>cotH</i> ^{D228Q} em pCD6	Cm Neo
pCD9	<i>cotH-strep-tag</i> em pJET1.2	Cm
pCD10	<i>cotH-strep-tag</i> em pACYC-Duet-1	Cm
pCD11	<i>cotH-strep-tag</i> em pAP39	Cm

6.3 Anexo 3 - Oligonucleotídeos

Tabela 6.3 - Oligonucleotídeos utilizados neste estudo¹

Primer	Sequência (5'-3') [*]
cotH95D	TTGAAAGCTTATGTACATAGCAACAACCGCC
cotH2140R	CCTAATTGTCAGTTTTTCCGCGAATACCC
cotGcotHD	GCGAGATTTTTTGTGAGTGCGGTGCGAC
cotGcotHR	CACCGCACTCACAAAAAATCTCGCCGCAGCTATAAGAAGTCATGCCGC
cotHD228Q_D	CACCTCGAACTATCAAGGGTTTGTCCACAAC
cotHD228Q_R	GTTGTGGACAAACCC TTG ATAGTTCGAGGTG
cotHD	CCGTTATCGCATATGAAGAACCAATCCAATTTACCGCTTTATCAGCTG
cotHR	CTCGAGTTATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCAAGCGCTTAAATACTTAAATGATCTTTGAGG TATTG

¹ Locais de restrição sublinhados; sequência de aminoácido de mutação pontual (glutamina) a Negrito e Itálico

6.4 Anexo 4 – Meios de cultura

Tabela 6.4 - Composição dos meios de cultura utilizados neste estudo

Meio de cultura	Composição
Luria – Bertanni (LB/LB agar)	10 g/L Triptona 5 g/L Extrato de levedura 5 g/L NaCl Se sólido adicionar 16g/L de agar (LB agar)
Meio de crescimento 1 (GM1)	96% (v/v) sais B&W ² 1 mM MgSO ₄ 0,5% (w/v) Glucose 0,1% (w/v) Extrato de levedura 0,05X aminoácidos B&W ² Conservar a 4°C.
Meio de crescimento 2 (GM2)	A GM1 adicionar: 0,28 mM de CaCl ₂ 2,8 mM de MgCl ₂
Meio de esporulação da Difco (DSM)	0,012% MgSO ₄ 0,1% KCl 0,8% (v/v) <i>Difco nutrient broth</i>
Meio de Auto-Indução	0,05 % Glucose (w/v) 0,5% Glicerol 0,2% α-lactose 0,33% (NH ₄)SO ₄ 0,68% KH ₂ PO ₄ 0,71% Na ₂ HPO ₄ 1 mM MgSO ₄ LB

² ver o anexo 6 - Soluções

6.5 Anexo 5 – Antibióticos

Tabela 6.5 - Antibióticos utilizados neste trabalho e respectivas concentração de utilização e de stock

Antibiótico	Concentração de Stock (mg/ml)	Concentração de utilização (µg/ml)	Solvente
Ampicilina (Amp)	100	100	ddH ₂ O
Neomicina (Neo)	10	1/3 ³	ddH ₂ O
Canamicina (Kan)	10	10/30 ³	ddH ₂ O
Cloranfenicol (Cm)	30	5/20 ⁴	Etanol

³ meio líquido / meio sólido

⁴ *B. subtilis* / *E. coli*

6.6 Anexo 6 – Soluções

Tabela 6.6 - Soluções utilizadas neste trabalho

Solução	Composição / Preparação
Germinação	
GFK	10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 1mM Glucose, 1mM Frutose, 10 mM KCl
Microscopia Eletrônica de Transmissão	
Tampão fosfato 0,1M	1.5% (w/v) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.16% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; pH 7,6
PHEM	120 mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EGTA, 4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Eletroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose	
TAE 1X	40 mM Tris, Ácido Acético 20 mM, 1 mM EDTA
Tampão Laranja	0,2% corante laranja G, 0,37% EDTA, 50% glicerol
Extração de DNA	
STET	8% sacarose, 0,5% TritonX-100, 50 mM EDTA e 10 mM Tris-HCl; pH 8.0
SET	20% Sacarose; 20 mM Tris pH 8.0; 10 mM EDTA
Extração de proteínas	
Tampão fosfatase alcalina 10X	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT
Tampão de amostra/Esporos 2X	1X <i>Upper Tris</i> , 5% Glicerol, 2 % (w/v) SDS, 0.5 mM DTT, 5 % 2-mercaptoetanol e 0,025 % (w/v) azul de bromofenol
Super-Produção de proteínas recombinantes	
Tampão VPEX-100	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.0; 10 % de glicerol
Purificação de CotB	
Tampão fosfato 8X	2.87% (w/v) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.25% (w/v)

	NaH ₂ PO ₄ .12H ₂ O; pH 7,6
Tampão <i>Start</i> – 8M	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 8M ureia
Tampão <i>Start</i> – 6M	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 6M ureia
Tampão <i>Start</i> – 4M	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 4M ureia
Tampão <i>Start</i> – 2M	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 2M ureia
Tampão <i>Start</i>	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol
Tampão <i>Start</i> - 8M + glicerol	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 8M ureia 10% de glicerol
Tampão <i>Start</i> -Imidazol 40 mM	Tampão fosfato 1x, 40 mM Imidazol
Tampão <i>Start</i> -Imidazol 100 mM	Tampão fosfato 1x, 100 mM Imidazol
Tampão <i>Start</i> -Imidazol 300 mM	Tampão fosfato 1x, 300 mM Imidazol
Tampão <i>Start</i> -Imidazol 500 mM	Tampão fosfato 1x, 500 mM Imidazol
Purificação de Coth	
Tampão W	150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl; pH 8.0
Tampão de Eluição - Destibiotina	150mM NaCl, 100mM Tris-HCl; pH 8.0; 2,5mM Destibiotina
Tampão de Regeneração	150mM NaCl, 100mM Tris-HCl; pH 8.0; 1 mM EDTA, 1 mM ácido 2-[4'-hidroxi-azobenzeno] benzóico
SDS-PAGE e Detecção Imunológica de Proteínas	
Gel de Resolução 12,5%/15%	12,5% / 15% Acrilamida (29:1); 0.375 M Tris.Cl; 0.1% SDS, pH 8.8; 0,8% APS e 5x10 ⁻⁴ % (v/v) TEMED
Gel de Concentração 4,5%	4,5% Acrilamida (29:1); 0.125 M Tris.Cl; 0.1% SDS, pH 6.8. 0,01% APS e 8x10 ⁻⁴ % (v/v) TEMED
Tampão de eletroforese 1X	125 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS
Tampão de amostra 10X	62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.02% Azul de bromofenol
Tampão do gel de concentração	0.125 M Tris.Cl, 0.1% SDS, pH 6.8.

Tampão do gel de resolução	0.375 M Tris.Cl, 0.1% SDS, pH 8.8.
PBS 10X	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄
TBS 10X	500 mM Tris.HCl, pH 7.4, 1,5 M NaCl
Tampão de transferência	25 mM Tris, 192 mM Glicina e 10% Etanol
Solução de lavagem	PBS 1X; 0,001% Tween-20
Solução de lavagem - Fosfato de serina	TBS 1X; 0,001% Tween-20
Solução de bloqueio	5% de leite magro em pó comercial em solução de lavagem
Solução de bloqueio – Fosfato de serina	5% de BSA (Sigma) em solução de lavagem – fosfato de serina
Solução de anticorpo	0,5% de leite magro em pó comercial em solução de lavagem
Solução de anticorpo – Fosfato de serina	5% de BSA (Sigma) em solução de lavagem - fosfato de serina
Persulfato de ammonia (APS)	10% (w/v) em ddH ₂ O. Manter a 4°C
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10% (w/v) em ddH ₂ O.
Fosforilação <i>in vitro</i>	
Tampão de fosforilação 10X	0,2M HEPES pH 7,6; 20 mM DTT, 5mM PMSF, 0,1 M MgCl ₂ , ATP-frio 1mM e 0,5uCi/μl [γ 32P]ATP
Meios	
Sais Bott and Wilson (B&W)	1,24% (w/v) K ₂ HPO ₄ , 0,76% (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,1% (w/v) citrato tri-sódico e 0,6% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; pH 7,6
5X aminoácidos B&W	2,5 mg/ml de trp, arg, lys, gly, met, his, val, thr e asp